

Université de Sherbrooke

**Mutants de l'antigène grand T du virus du polyome
affectés dans la réplication virale**

par

Bruno Lemieux

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc)

Novembre 1997



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-35693-0

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.....	i
Liste des illustrations.....	iv
Liste des tableaux.....	v
Liste des abréviations.....	vi
Résumé	
Introduction.....	1
Matériel et méthodes.....	25
I. Souche virale.....	25
II. Plasmides recombinants.....	25
III. Méthodes de clonage.....	27
i. Préparation des bactéries compétantes.....	28
ii. Transformation des bactéries compétantes.....	28
iii. Analyse des colonies recombinantes.....	29
iv. Production d'ADN.....	30
IV. Culture cellulaire.....	30
i. Clonage des lignées NIH3T3, FR3T3.....	31
ii. Fibroblastes d'embryons de souris: Préparation de cellules...	31
V. Transfection des cellules en culture.....	32
i. Transfection selon la méthode au polybrène-DMSO.....	32
ii. Transfection à la LipofectAMINE TM Reagent.....	33
VI. Détermination <i>in vivo</i> de l'efficacité de réplication de	
l'ADN recombinant.....	33
i. Extraction de l'ADN épisomique des lignées NIH3T3,	
FR3T3 et cellules embryonnaires de souris.....	33
ii. Mesure indirecte de l'efficacité de réplication de l'ADN	
recombinant.....	34
iii. Préparation d'une sonde d'ADN radioactive.....	35
iv. Transfert de l'ADN sur membrane de Nylon	
(<i>Southern blotting</i>).....	36

a. Technique Southern.....	36
b. Technique VacuGene TM XL Vacuum blotting System.....	37
v. Préhybridation et hybridation de la membrane de Nylon.....	38
VII. Transactivation de promoteurs par l'antigène grand T.....	38
i. Extraction des protéines des cellules transfectées.....	38
ii. Réaction enzymatique.....	39
iii. Extraction et chromatographie.....	40
VIII. Isolation d'ADNc de kinases cellulaires dans les cellules NIH3T3.....	40
i. Transfection des cellules NIH3T3.....	40
ii. Extraction de l'ARN total par TRIzol® Reagent.....	41
iii. Réaction de transcription inverse.....	41
iv. Réaction de PCR.....	42
v. Incorporation du produit de PCR dans le vecteur pBluescript SK+.....	42
iv. Détermination de la séquence nucléotidique de l'ADN.....	43
Résultats.....	44
I. Activité répliquative du domaine carboxy-terminal (CT) et complémentation par le domaine amino-terminal de grand T (LT).....	44
1. Construction du vecteur d'expression de LT sous le promoteur CMV.....	44
2. Efficacité répliquative de CT dans différents types cellulaires..	47
2.1 Réplication dans les cellules FR3T3.....	47
2.2 Réplication dans les cellules NIH3T3.....	48
2.3 Réplication dans les cellules embryonnaires de souris.....	49
II. Complémentation de CT par les antigènes moyen T et petit T...	52
III. Mutation 13val et réplication virale.....	56
1. Implication de la mutation 13val dans la réplication.....	56

2. Construction du mutant NT13val et du mutant NT16val.....	58
3. Effet du mutant NT13val.....	61
IV. Mutation 13val et cycle cellulaire.....	62
1. Transactivation d'un promoteur sous le contrôle d'éléments E2F: Liaison à pRB.....	63
2. Effet de petit T sur la transactivation d'un promoteur E2F....	68
V. Mutation dl97 et réplication virale.....	69
1. Complémentation de CT par LTdl97.....	69
2. Construction d'un mutant LTdl97 tronqué en carboxy- terminal.....	72
3. Effet du mutant tronqué LTdl97Δct.....	75
4. Construction du double mutant: LTdl97zn-.....	76
5. Effet du mutant LTdl97zn-.....	79
6. Caractère dominant négatif de la mutation dl97.....	79
VI. Phosphorylation des antigènes grand T.....	83
1. Grand T de SV40.....	83
2. Grand T de polyome.....	85
3. Induction de gènes par NT.....	85
Discussion.....	87
Activité du domaine CT de grand T de polyome et stimulation par NT.....	87
Mutation 13val, réplication et cycle cellulaire.....	90
Effet <i>trans</i> de la stimulation de la réplication virale.....	93
Mutation dl97 et réplication virale.....	97
Remerciements.....	100
Références.....	101

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Carte physique du génome viral.....	4
Figure 2 : Structure de l'origine de réplication virale.....	5
Figure 3 : Carte physique de la région précoce du virus du polyome.....	11
Figure 4 : Représentation schématique de la protéine grand T de polyome.....	14
Figure 5 : Comparaison entre les antigènes grand T de polyome et de SV40.....	15
Figure 6 : Modèle de l'initiation de la réplication virale de SV40.....	18
Figure 7 : Régulation de la progression de la phase G ₁ /S dans les cellules de mammifères.....	21
Figure 8 : Caractéristiques des mutants de grand T affectés dans la réplication virale.....	23
Figure 9 : Construction des vecteurs pCMV-LTdl97 et pCMV-LT.....	45-46
Figure 10 : Activité répllicative des domaines CT et NT dans différents types cellulaires.....	50
Figure 11 : Complémentation de CT par les antigènes T moyen et petit T.....	54
Figure 12 : Activité répllicative de la mutation 13val.....	57
Figure 13 : Construction du vecteur pPyNT13val (et pPyNT16val).....	59-60
Figure 14 : Transactivation d'un promoteur sous le contrôle d'éléments E2F.....	66-67
Figure 15 : Activité répllicative du mutant LTdl97 et du mutant LTdl97 tronqué en carboxy-terminal.....	70-71
Figure 16 : Construction des vecteurs pCMV-LTdl97Δact et pCMV-NTΔact.....	73-74
Figure 17 : Construction du vecteur pCMV-LTdl97zn-.....	77-78
Figure 18 : Activité répllicative du double mutant LTdl97zn-.....	80-81
Figure 19 : Contrôle <i>in vitro</i> de l'activité répllicative de l'antigène grand T de SV40 par la phosphorylation.....	84
Figure 20 : Modèle d'activation du domaine réplcatif de grand T.....	92
Figure 21 : Représentation du domaine J.....	95
Figure 22 : Modèle du caractère dominant négatif de LTdl97.....	98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Activité répllicative des domaines CT et NT dans différents	
types cellulaires.....	51

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1. Abréviations générales

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
BSA	Albumine Sérique Bovine
DEPC	Diéthyl Pyrocarbonate
DMEM	Milieu Eagle modifié par Dulbecco
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
LB	milieu de Luria-Bertani
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SVF	Sérum de veau foetal
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

2. Unités de mesure

°C	Degré Celcius
kb	Kilo paire de bases
kDa	KiloDalton
M	Molaire
mM	Millimolaire
nm	Nanomètre
nt	Nucléotide

pb	Paire de base
p/v	Poids/volume
rpm	Révolutions par minute
μCi	MicroCurie
μg	Microgramme
μl	Microlitre
v/v	Volume/volume

RÉSUMÉ

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la réplication du virus du polyome, nous avons déterminé l'impact que possède différents mutants de grand T qui sont affectés dans cette fonction. Les mutants sont classés en deux catégories, avec ou sans activité répllicative. La production de doubles mutants ainsi que la complémentation entre les mutants a permis de démontrer que l'antigène grand T est influencé par différents facteurs en *cis* et *trans*. Ces facteurs *cis* et *trans* permettent à grand T de répliquer efficacement un vecteur ADN portant l'origine de réplication virale dans différents types cellulaires.

Le domaine amino-terminal (NT) de grand T joue un rôle prépondérant dans l'activité de l'antigène. En plus de permettre l'avancement du cycle cellulaire par sa liaison au produit du gène du rétinoblastome, il stimule en *trans* l'activité du domaine carboxy-terminal (CT) à un niveau comparable à celui de grand T. De plus, dans le contexte de grand T, le domaine NT stimule la portion CT par un effet *cis*. La fonction attribuable à NT peut être liée à l'observation récente que les séquences N-terminales des antigènes T présentent une homologie avec les domaines J des chaperones moléculaires DnaJ. L'absence ou un changement dans la structure du domaine J dans grand T du virus du polyome diminue son efficacité répllicative. Ces mutants peuvent être complétés par NT. Toutefois, la présence du domaine J n'est pas seule responsable de l'activité de NT; une dualité entre le domaine J et le domaine de liaison à pRB est envisagée.

L'absence d'un site de phosphorylation (a.a. 270-280) de grand T impliqué dans la réplication attribue un caractère dominant négatif au mutant LTdl97. Par la formation d'hexamères hétérogènes inactifs avec grand T, via la structure en doigt de zinc, LTdl97 prévient un événement de phosphorylation et/ou déphosphorylation conduisant à l'inactivation de l'hexamère.

INTRODUCTION

Les virus du type polyome sont des modèles de choix pour l'étude de la réplication de l'ADN. À l'exception d'un seul gène viral, ces virus dépendent de la cellule pour se répliquer. Le gène viral contrôle la cellule infectée, et, à l'aide de la machinerie de réplication cellulaire, permet la réplication de son génome. Ces petits virus à ADN ont également été grandement utilisés pour l'étude de la carcinogénèse et ont permis une meilleure compréhension des événements en cause.

Le cancer est l'aboutissement d'un processus progressif impliquant de nombreux événements indépendants (Bishop, 1987, 1991; Hunter, 1992). Chacun de ces événements est le résultat d'altérations au niveau génétique qui modifient la structure et l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la division et de la différenciation cellulaire. Il y a deux catégories de gènes impliqués dans la carcinogénèse; les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Grâce à nos connaissances sur les oncogènes viraux et cellulaires, deux étapes de la carcinogénèse *in vitro* ont été identifiées: l'immortalisation et la transformation (Land, *et al.*, 1983; Ruley, 1983; Weinberg 1985). Les oncogènes immortalisants tels que myc, E1A et grand T du virus du polyome sont localisés au noyau, assurant un potentiel de croissance illimitée aux cellules primaires. Les oncogènes transformants tels que ras, E1B et T moyen de polyome ont une localisation cytoplasmique et confèrent aux cellules établies en culture les propriétés néoplasiques attribuées aux cellules transformées: l'indépendance d'ancrage, les changements morphologiques et la perte d'inhibition de contact (Bastin, 1992). L'étude de la carcinogénèse soulève un problème majeur, celui de déterminer comment les oncogènes et les

gènes suppresseurs de tumeurs contribuent à la transformation des cellules et comment les modes d'action de ces gènes sont reliés.

Tout comme l'étude de la réplication de l'ADN, les virus oncogènes à ADN constituent un modèle de choix pour l'étude de la carcinogenèse car un petit nombre de protéines virales est suffisant pour initier la transformation cellulaire et la formation de tumeurs chez les animaux (Tooze, 1981; Salzman, 1986; Villareal, 1989). Ces protéines virales ont fourni des indices importants sur les causes et la nature du cancer, ainsi que sur les mécanismes normaux qui contrôlent la croissance et la division cellulaires chez les animaux pluricellulaires. De tels virus procurent ainsi des moyens d'identifier les mécanismes qui sont normalement responsables des contrôles de la division cellulaire. Le virus du polyome est surtout utilisé au laboratoire comme modèle d'étude de la carcinogenèse à étapes multiples puisque deux de ses gènes, l'un immortalisant et l'autre transformant, sont requis pour la transformation oncogénique (Asselin *et al.*, 1983; 1984; 1986; Rassoulzadegan *et al.*, 1982; 1983). Dans ce travail, je m'intéresse particulièrement à la réplication de l'ADN viral et de l'implication de l'antigène grand T.

Le virus du polyome est un membre de la famille des *papovaviridae* (Tooze, 1981), famille de petits virus oncogènes à ADN incluant le virus du polyome du hamster (HaPV), le virus simien 40 (SV40) du singe Rhésus, le virus LPV du singe vert, les virus du papillome humain (HPV) ainsi que les virus humain BK et JC (Tooze, 1981; Shah, 1990). Le virus du polyome a d'abord été mis en évidence dans des adénocarcinomes de glandes salivaires de souris, l'hôte naturel (Gross, 1953a; 1953b). Mais il peut induire une grande variété de tumeurs chez différentes espèces de rongeurs d'où il doit son nom (Stewart et Eddy, 1959).

La réponse des cellules à l'infection par un virus du type polyome peut revêtir des formes différentes, alternatives. Parmi les différents paramètres observables, l'aptitude à produire ou non de nouvelles particules virales est employée pour qualifier cette réponse. Ainsi, une infection productive est caractérisée par un cycle viral complet, où il y a réplication du génome viral et production de nouveaux virions aboutissant à la mort (lyse) des cellules productrices. Cette forme d'infection se retrouve dans les cellules de souris, dites permissives. L'infection non-productive a lieu en raison d'un blocage du cycle viral. On ne détecte pas de multiplication du virus. Ce cas se présente chez les cellules non-permissives, telles que les cellules de singe. Les cellules des autres rongeurs, rat et hamster, sont dites semi-permissives au virus du polyome et sont le lieu de la transformation réversible et permettent un faible niveau de réplication. Certaines de ces cellules peuvent présenter les caractéristiques de cellules transformées avant la perte des gènes viraux et le retour au phénotype cellulaire normal. Éventuellement, le génome viral peut persister dans quelques cellules, suite à son intégration dans le génome cellulaire. L'expression constitutive de certains gènes viraux peut alors avoir sur la cellule hôte des répercussions sur son comportement et provoquer une transformation néoplasique. Chez les rongeurs, une telle intégration du génome viral peut induire la formation de tumeurs (Tooze, 1981).

Le génome du virus du polyome est caractérisé par une molécule d'ADN bicaténaire circulaire de 5292 pb associée à des histones cellulaires (figure 1) (Soeda *et al.*, 1980). La chromatine virale est logée à l'intérieur d'une capside icosahédrique de 45 nm de diamètre (Tooze, 1981). Il y a deux régions codantes, qualifiées de précoce et tardive en référence au moment où elles sont exprimées au cours du cycle viral. Les gènes de la région précoce sont transcrits avant le démarrage de la réplication de l'ADN viral et ceux de la région tardive

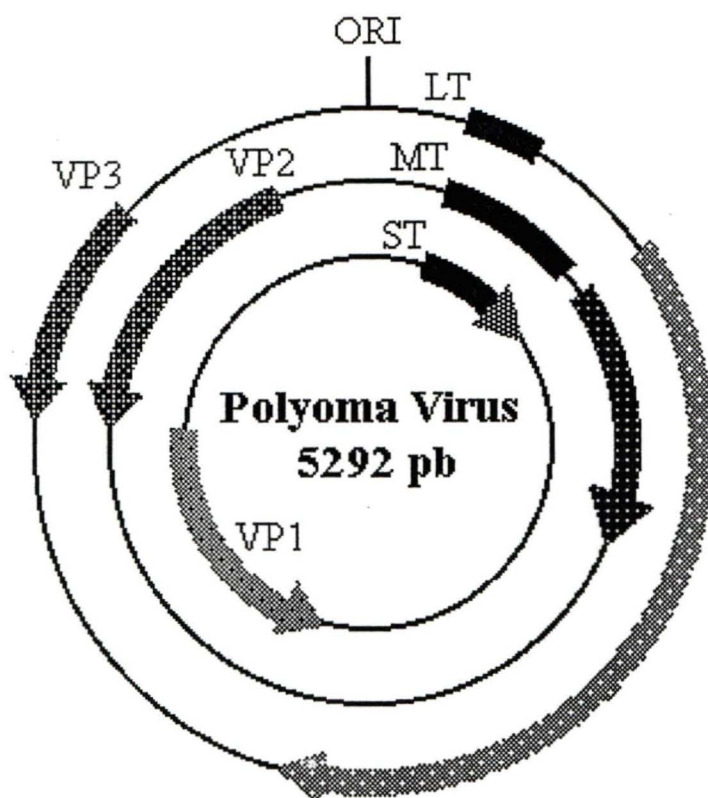


Figure 1. Carte physique du génome viral. Représentation des régions codantes de la souche A2 du virus du polyome (adaptation de Tooze, 1981). Deux transcrits primaires sont produits de part et d'autre de l'origine de réplication et sont épissés de façons différentes pour produire chacun trois protéines. Les antigènes grand T (LT) T moyen (MT) et petit T (ST) proviennent du transcrit précoce. Les protéines de la capside, VP1, VP2, VP3 proviennent du transcrit tardif.

seulement après. Les gènes précoces et tardifs sont transcrits sur des brins complémentaires en direction opposée à partir d'une région de contrôle. Cette région de contrôle sépare les gènes précoces et tardifs par des séquences régulatrices qui régissent l'expression et la réplication du génome viral (Tyndall *et al.*, 1978; Luthman *et al.*, 1982). Ces séquences régulatrices portent, une origine de réplication, les deux promoteurs viraux: le promoteur tardif et le promoteur précoce ainsi qu'un élément enhancer (figure 2); (Soeda *et al.*, 1980). L'origine de réplication est composée de trois éléments essentiels, une séquence riche en résidus Adénine/Thymidine (A/T), une séquence palindromique et des répétitions imparfaites (Prives *et al.*, 1987). Ces éléments forment le coeur de l'origine de réplication. Toutefois, une réplication efficace du génome nécessite également une des sous-unités de l'enhancer (de Villiers *et al.*, 1982; Muller *et al.*, 1988). Le promoteur précoce est composé d'une boîte CAAT et d'une boîte TATAA dirigeant l'initiation de la transcription des gènes précoces aux nucléotides 148 et 153 (Heiser et Eckhart, 1982; Kamen *et al.*, 1982; Cowie *et al.*, 1982). Le promoteur tardif, lui, ne possède pas de boîte TATAA de sorte que la transcription tardive débute à 15 endroits différents entre les nucléotides 5075 et 5170 (Cowie *et al.*, 1981). L'élément enhancer est une séquence d'ADN qui stimule la transcription virale indépendamment de sa distance ou de son orientation vis-à-vis le promoteur (Khoury et Gruss, 1983). L'enhancer est divisé en sous-unités α et β (Mueller *et al.*, 1988). Il existe une homologie de séquences entre la sous-unité α et l'enhancer du gène E1A d'adénovirus et entre la sous-unité β et l'enhancer de SV40 (Herbomel *et al.*, 1984). Une seule des sous-unités est suffisante pour exercer une régulation positive sur la transcription précoce et tardive (Mueller *et al.*, 1984).

Pour se répliquer, le virus du polyome dépend exclusivement de la machinerie de réplication cellulaire, à l'exception de la protéine virale grand T (DePamphilis et Bradley, 1986). En effet, la structure de son origine correspond à celle d'une origine de réplication eucaryotique; elle comprend un *core* et des éléments auxiliaires qui stimulent la réplication dans certains types cellulaires (DePamphilis, 1992; DePamphilis *et al.*, 1988; Wong et Schaffer, 1991). Le *core* est la séquence minimale requise pour initier la réplication et détermine l'endroit où la réplication commence (Hendrickson *et al.*, 1987). L'origine de réplication du virus du polyome, le *core*, ne fonctionne qu'en présence de l'antigène grand T et de l'ADN polymérase α -primase de souris (Murakami *et al.*, 1986). Le *core* est composé d'environ 65pb et comprend trois éléments (figure 2): un palindrome avec deux sites de fixation de grand T sur chaque brin. De part et d'autre de ce palindrome il y a, une région riche en A/T qui provoque une certaine courbure de l'ADN et une séquence dont l'un des brins est riche en purines et l'autre en pyrimidines. Cette dernière région est une région d'ADN facile à dénaturer. C'est à cet endroit qu'a lieu l'initiation de la synthèse d'ADN (Lorimer, 1992). Près du *core*, il existe des sites de fixation pour des facteurs de transcription (Hassell *et al.*, 1986), ces éléments auxiliaires (*aux-1* et *aux-2*) facilitent l'activité du *core*. L'*auxiliaire-1*, du côté tardif du *core*, contient deux sites de fixation (A et B) de grand T; il stimule l'activité du *core* de 5 à 10 fois (Weichselbraun *et al.*, 1989). L'*auxiliaire-2* correspond aux éléments α et β de l'enhancer et stimule la réplication de 200 à 1000 fois (Muller *et al.*, 1988; Veldman *et al.*, 1985). La sous-unité α (nt 5021-5130) contient les motifs de reconnaissance de trois facteurs PEA1, PEA2 et PEA3. PEA1 (Polyoma Enhancer Activator 1) est l'équivalent murin du facteur de transcription humain AP1 (Martin *et al.*, 1988; Muller *et al.*, 1988; Murakami *et al.*, 1990). PEA1 coopère avec l'hétérodimère PEA2 dans son activité de liaison à l'ADN (Martin *et al.*, 1988). Une protéine PEA3 de la famille

des proto-oncogènes *ets* a été clonée à partir de cellules embryonnaires de souris (Xin *et al.*, 1992). La sous-unité β (nt 5131-5265) possède une structure complexe et peut potentiellement lier une dizaine de facteurs de transcription (Jones *et al.*, 1988). Elle présente des séquences homologues à l'enhancer de SV40 (Herbomel *et al.*, 1984; Piette *et al.*, 1985).

Les éléments auxiliaires ne sont pas toujours nécessaires pour qu'il y ait réplication. Par exemple, la séquence du core est suffisante pour permettre la réplication dans certaines conditions *in vitro* (Prives *et al.*, 1987), mais pas dans d'autres conditions (Guo *et al.*, 1989). *In vivo*, l'origine de polyome peut se répliquer efficacement en absence de la séquence de l'auxiliaire-2 dans des embryons de souris à une cellule; mais l'auxiliaire-2 est nécessaire dans des embryons à deux cellules (Martinez-Salas *et al.*, 1988; 1989). Les éléments auxiliaires n'affecteraient pas le mécanisme de réplication. C'est ainsi que la délétion de l'auxiliaire-1 n'affecte pas la bidirectionnalité des fourches de réplication (Guo *et al.*, 1991). Les auxiliaires pourraient réguler la réplication en déterminant plutôt le moment d'initiation. Par exemple, l'origine de polyome ne fonctionne que dans les types cellulaires murins qui peuvent activer son enhancer (Bennett *et al.*, 1989; Campbell et Villareal, 1988; Melin *et al.*, 1991; Rochford *et al.*, 1990). Dans la région régulatrice du virus du polyome, les séquences impliquées dans la réplication et dans la transcription se chevauchent. En outre, des mutations de l'enhancer qui affectent l'activité répllicative affectent également l'activité transcriptionnelle (Martin *et al.*, 1988; Satake *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 1987). Des études récentes ont montré que le fonctionnement de l'auxiliaire-2 requiert la liaison des facteurs de transcription (Baru *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 1991; Wasylyk *et al.*, 1990). D'autres résultats suggèrent néanmoins que ce sont des facteurs cellulaires différents qui sont impliqués dans les deux activités de réplication et transcription. Alors que l'enhancer peut être situé à une

certain distance du promoteur pour le stimuler, une stricte orientation spatiale est requise vis-à-vis de l'origine pour l'activer (Hassell *et al.*, 1986; Murakami *et al.*, 1991; O'Connor et Subramani, 1988). De la même manière, certaines mutations peuvent éliminer l'activité promotrice sans éliminer l'activité du core (Nilsson *et al.*, 1991). Il y aurait seulement les facteurs de transcription dont le domaine d'activation interagit avec le complexe d'initiation qui stimulerait l'activité répllicative (DePamphilis, 1992).

La région tardive encode les protéines structurales VP1, VP2 et VP3 (figure 1) (Fine *et al.*, 1968; Gibson, 1974) dont l'assemblage constitue la capside virale. La région précoce, elle, génère par épissage alternatif du transcrit primaire, trois protéines de taille différente et qualifiées selon leur poids moléculaire, les antigènes grand T, T moyen et petit T (figure 1). Chacune de ces protéines possède des propriétés et des fonctions distinctes dans la carcinogenèse à étapes multiples mais l'antigène grand T joue un rôle majeur dans la réplication.

Les trois antigènes sont produits avant l'initiation de la réplication (Ito, 1977; Schaffhausen, 1978). Les antigènes T ne possèdent pas seulement le même transcrit primaire, ils utilisent le même codon d'initiation (figure 3). Les trois protéines ont donc en commun les 79 premiers acides-aminés. T moyen et petit T présentent en commun 112 acides-aminés additionnels. Toutefois chaque protéine possède une région C-terminale unique due à un changement de cadre de lecture résultant de l'événement d'épissage (figure 3); (Hutchinson *et al.*, 1978; Smart et Ito, 1978; Kamen *et al.*, 1980; Soeda *et al.*, 1980).

L'antigène petit T est une protéine de 22 kDa retrouvée à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules infectées par le virus du polyome (Zhu *et al.*, 1984). Il est nécessaire au cycle lytique du virus. Petit T exerce un effet stimulant sur la réplication du génome viral (Türler et Salomon, 1985; Templeton *et al.*, 1986; Berger et Wintersberger, 1986; Ogris *et al.*, 1992) et est requis pour l'assemblage du virion (Martens *et al.*, 1989). Toutefois, dans des essais *in vitro*, petit T inhibe la réplication virale (Carbone *et al.*, 1992). Dans la carcinogenèse, petit T complète l'antigène T moyen dans la transformation des cellules primaires en culture (Asselin *et al.*, 1986) et dans l'induction de tumeurs chez les rats nouveaux-nés (Asselin *et al.*, 1983). L'antigène petit T n'est pas immortalisant. Les propriétés biochimiques de petit T sont peu connues. Lorsqu'il est exprimé seul dans des fibroblastes, petit T permet une croissance cellulaire à une très haute densité (Cherington *et al.*, 1986; Noda *et al.*, 1986). Toutefois, petit T n'induit pas les changements morphologiques associés à la transformation. Tout au plus, il confère une habilité limitée à la croissance en agar mou. Dans des cellules privées de sérum, petit T peut contribuer à l'induction de la phase S (Berger et Wintersberger, 1986; Ogris *et al.*, 1992).

Il existe une similarité de séquences et de fonctions entre petit T de SV40 et petit T de polyome. L'antigène petit T des deux virus, forme un complexe avec les unités catalytique et régulatrice de la protéine phosphatase 2A (Pallas *et al.*, 1988, 1990). Chez SV40, cette interaction peut stimuler la voie des MAP kinases (Sontag *et al.*, 1993). La protéine phosphatase 2A est une sérine phosphatase qui joue un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire. Il est possible que l'association avec petit T inactive la protéine phosphatase 2A ou change la spécificité de son substrat (Scheidtmann *et al.*, 1991a, 1991b; Shenolikar et Nairn, 1991).

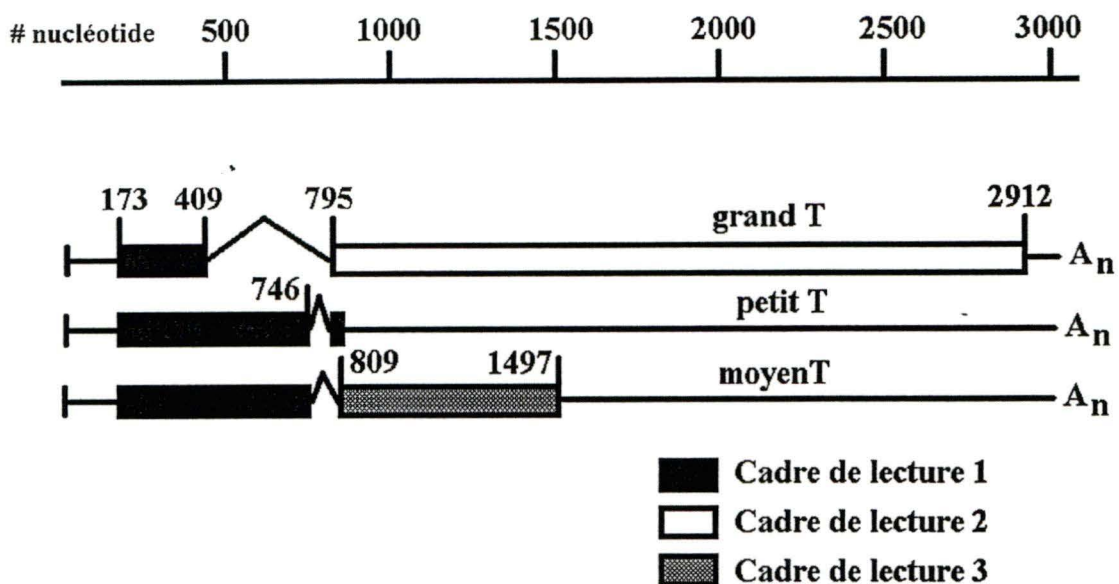


Figure 3. Carte physique de la région précoce du virus du polyome. La région précoce encode trois oncogènes dont les séquences se chevauchent. L'épissage différentiel d'un même transcrit d'ARN assure la production des antigènes grand T, T moyen et petit T. L'utilisation du même cadre de lecture au niveau du premier exon fait en sorte que les trois antigènes T possèdent les mêmes premiers 79 acides aminés. Par contre, la longueur des séquences exoniques et introniques ainsi que les cadres de lecture des seconds exons sont différents pour chacun des oncogènes (Bastin, 1992).

L'antigène T moyen est une phosphoprotéine cytoplasmique de 56 kDa associée aux membranes cellulaires (Ito *et al.*, 1977; Ito, 1979; Dilworth *et al.*, 1986). Cette protéine contient une séquence hydrophobique en C-terminal, responsable de sa localisation. L'association avec la membrane est nécessaire à T moyen pour exercer son rôle dans la transformation virale (Carmichael *et al.*, 1982). T moyen est absolument requis pour la transformation par le virus du polyome (Carmichael *et al.*, 1982; Templeton et Eckhart, 1982; Carmichael *et al.*, 1984; Templeton *et al.*, 1984). Cet antigène joue un rôle important dans la transformation néoplasique *in vitro* et dans la tumorigénèse *in vivo*. L'expression de T moyen seul confère le phénotype transformé aux cellules déjà établies en culture (Treisman *et al.*, 1981; Mes et Hassell, 1982; Gélinas et Bastin, 1985). Toutefois, T moyen ne peut transformer efficacement des cellules primaires (telles que des cellules fibroblastiques d'embryon de rat) sans être complété par un second oncogène comme grand T, Ad-2 de E1A d'adénovirus ou myc (Rassoulzadegan *et al.*, 1982; Land *et al.*, 1983; Ruley, 1983). Pareillement, T moyen seul ne provoque pas de tumeurs lorsque son gène est injecté dans des rats nouveau-nés (Asselin *et al.*, 1983). Cependant dans des souris transgéniques, T moyen induit à lui seul des hémangiomes, des adénocarcinomes mammaires et des tumeurs de la glande pituitaire (Bautch *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1988, 1989; Guy *et al.*, 1992).

Dans la cellule transformée, T moyen forme des complexes avec les protéines cellulaires pp60^{c-src}, pp62^{c-yes}, et pp59^{c-fms} (Courtneidge et Smith, 1983, 1984; Kornbluth *et al.*, 1986, 1990; Courtneidge, 1989; Kypta *et al.*, 1988). L'association de T moyen avec le produit des gènes *c-src* et *c-yes* stimule leur activité tyrosine kinase et semble être essentielle au maintien du phénotype transformé. L'antigène T moyen active la protéine kinase *c-src* en empêchant la phosphorylation du résidu tyrosine 527 de *c-src* (Cartwright *et al.*, 1986; Cheng

et al., 1989). En effet, plusieurs études ont montré que la phosphorylation de la tyrosine 527 inhibe l'activité kinasique et la capacité transformante de *c-src* (Cartwright *et al.*, 1987; Cooper et King, 1986; Kmiecik et Shalloway, 1987; Piwnica-Worms *et al.*, 1987). Le complexe T moyen/pp60^{c-src} interagit avec et active l'enzyme phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) des cellules transformées (Whitman *et al.*, 1985, 1987; Courtneidge et Heber, 1987). La PI 3-K activée convertit le phosphatidylinositol en phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3-P). Le PI3-P semble être un second messenger important dans l'oncogenèse et dans la régulation de la prolifération cellulaire (Whitman *et al.*, 1988; Kaplan *et al.*, 1988). L'antigène T moyen forme également un complexe avec la protéine phosphatase 2A (Pallas *et al.*, 1990; Ruediger *et al.*, 1992).

L'antigène grand T de la souche A2 de polyome est une phosphoprotéine multifonctionnelle de 785 acide aminés. Une représentation schématique de la protéine et de ses principales caractéristiques est montrée à la figure 4. Comme mentionné précédemment, grand T présente les mêmes 79 premiers acides aminés que T moyen et petit T. De plus, il existe des régions d'homologies entre grand T de polyome et grand T de SV40 (figure 5). Les deux protéines démontrent beaucoup de fonctions similaires, entre autres l'initiation de la réplication, que l'on peut faire une forte analogie entre elles. Toutefois, il existe une différence majeure entre les deux, grand T de SV40 est à lui seul transformant, ce qui n'est pas le cas de grand T de polyome (Schaffhausen, 1982). Cette fonction chez SV40 serait attribuable à sa capacité à se complexer avec la protéine p53, une protéine suppresseur de tumeur (Zhu *et al.*, 1991). Le site de liaison à p53 se retrouve en C-terminal de la protéine (figure 5) (Fanning et Knippers, 1992), une région de grand T de SV40 qui n'est pas présente chez grand T de

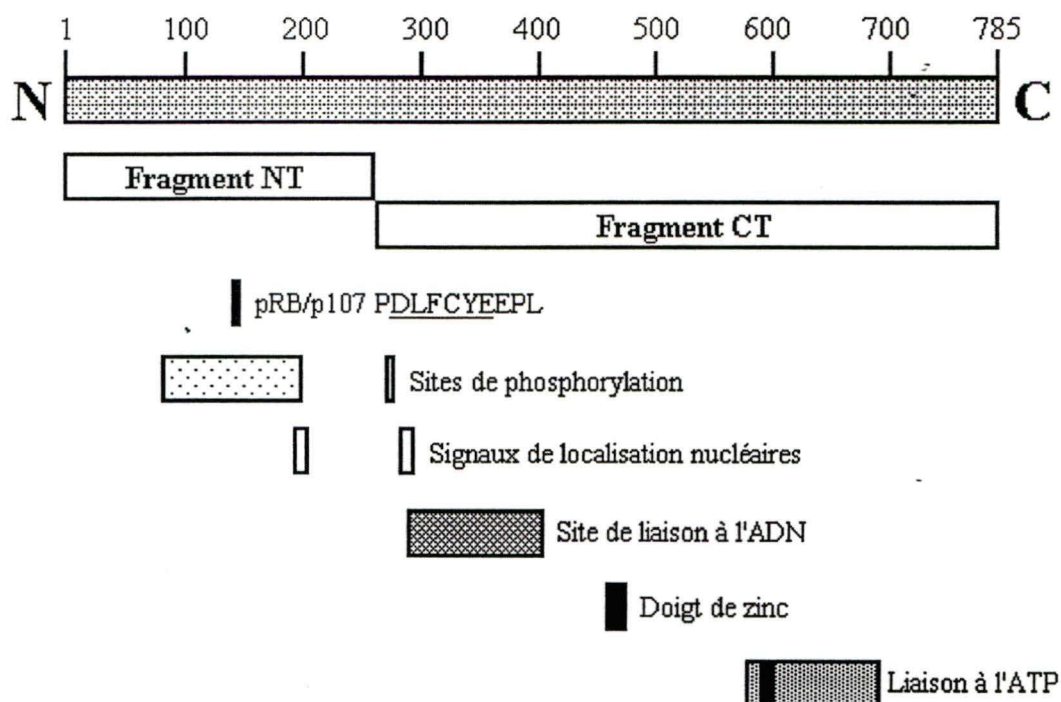


Figure 4. Représentation schématique de la protéine grand T de polyome. (D'après Gjorup et coll. (1994). L'antigène grand T du virus du polyome est représenté avec ses principales structures et activités, ainsi que les fragments amino-terminal (NT), a.a. 1-259 et carboxy-terminal (CT), a.a. 264-785. Site de liaison à pRB/p107, a.a. 140-150 (Dyson *et al.*, 1990; Larose *et al.*, 1991; Freund *et al.*, 1992; Maione *et al.*, 1994); Sites de phosphorylation, a.a. ~80-200 & 267-278 (Bockus et Schaffhausen, 1987a); Signaux de localisation nucléaires, a.a. ~190 & 280 (Richardson *et al.*, 1986); Site de liaison à l'ADN, a.a. 282-398 (Sundstrom *et al.*, 1991); Doigt de zinc, a.a. 452-472 (Berg, 1986; Loeber *et al.*, 1991); liaison à l'ATP, a.a. ~570-685 (Bradley *et al.*, 1987; Gaudray *et al.*, 1980).

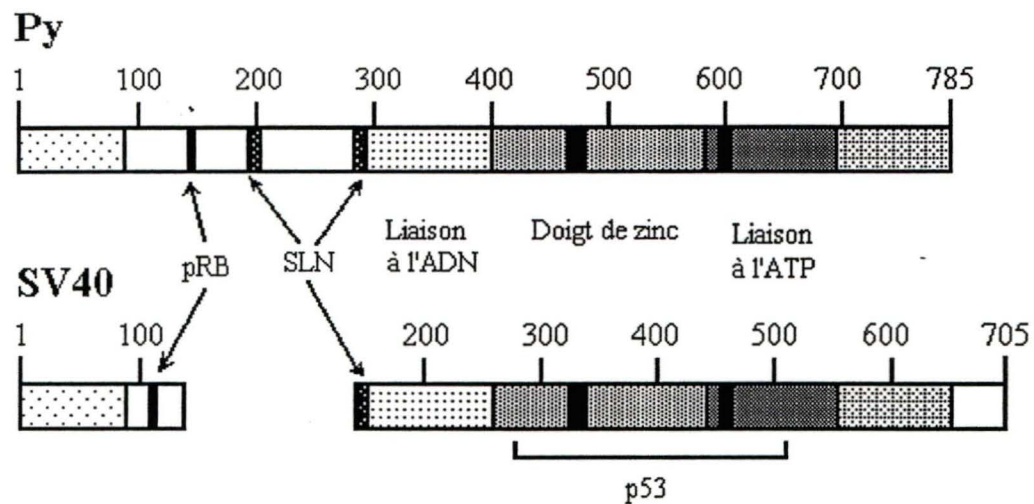


Figure 5. Comparaison entre les antigènes grand T de polyome et de SV40. Les séquences de la protéine grand T de polyome et de SV40 sont alignées en accord avec les régions d'homologies (Pipas, 1992). Les motifs importants et la localisation approximative sont indiqués: site de liaison à pRB, p107 et p130 (pRB); Signaux de localisation nucléaire (SLN), domaine de liaison à l'ADN, doigt de zinc, domaine de liaison à l'ATP, site de liaison à p53. Les espaces ouverts ne sont pas très bien conservés entre les protéines.

polyome. Pour le virus du polyome, l'activité transformante est portée par T moyen et agit sur différents niveaux des voies de transmission du signal.

Grand T est localisé dans le noyau des cellules infectées (Oxman *et al.*, 1972; Schaffhausen *et al.*, 1978; Silver *et al.*, 1978; Dilworth *et al.*, 1986). Il contient deux signaux de localisation nucléaire (figure 4); (Richardson *et al.*, 1986). Chaque signal étant apte à localiser la protéine au noyau. Dans le noyau, grand T est retrouvé sous forme dimérique, tétramérique, hexamérique ou complexé avec plusieurs protéines cellulaires. Au cours du cycle lytique du virus, l'antigène grand T est impliqué au niveau de la stimulation de la synthèse de l'ADN cellulaire, de l'initiation de la réplication du génome viral (Francke et Eckhart, 1973; Schlegel et Benjamin, 1978), de la transactivation du promoteur tardif (Cogen, 1978; Farmerie et Folk, 1984; Kern *et al.*, 1986; Pannuti *et al.*, 1987) et de la répression de l'expression des gènes précoces. L'antigène grand T est capable de se lier à l'ADN bicaténaire de façon non spécifique, cependant il forme une liaison spécifique avec la région régulatrice du génome viral (Gaudray *et al.*, 1981; Pomerantz *et al.*, 1983; Cowie et Kamen, 1984; Prives *et al.*, 1987). Grand T possède une forte affinité pour le pentanucléotide G(A/G)GGC (Pomerantz et Hassell, 1984).

La région régulatrice du génome viral contient 15 séquences G(A/G)GGC organisées en six sites de fixation pour grand T (figure 2). Son affinité pour les sites 1, 2 et 3 est environ dix fois moins élevée que pour les sites A, B, et C (Cowie et Kamen, 1984; Scheller et Prives, 1985). L'attachement de grand T aux sites 1 et 2 est requise pour l'initiation de la réplication (Prives *et al.*, 1987) tandis que la répression de l'expression des gènes précoces requiert la fixation de grand T aux sites A et B (Farmerie et Folk, 1984; Dailey et Basilico, 1985).

L'activation de l'expression des gènes tardifs par grand T ne semble pas nécessiter l'interaction directe avec l'ADN (Pannuti *et al.*, 1987). Toutefois, la transactivation du promoteur tardif est dépendante de la réplication de l'ADN viral (Cahill *et al.*, 1990).

L'antigène grand T possède des activités ATPase et ADN hélicase intrinsèques (Gaudray *et al.*, 1981; Stahl *et al.*, 1986; Scheffner *et al.*, 1989). Cette dernière activité permet l'ouverture de l'ADN double brin au niveau de l'origine virale pour ainsi initier la réplication du génome viral (Dean *et al.*, 1987; Dodson *et al.*, 1987; Wold *et al.*, 1987). Ce que l'on sait sur la réplication du génome viral des papovavirus provient principalement d'études faites avec l'antigène grand T de SV40 (Fanning et Knippers, 1992). En présence d'ATP, il y a formation de deux hexamères composé par l'antigène grand T. Ces hexamères se fixent sur le *core* de l'origine (figure 6); (Mastrangelo *et al.*, 1989; Wessel *et al.*, 1992). La formation des hexamères est dépendante de la séquence doigt de zinc retrouvée en C-terminal de la protéine (Loeber *et al.*, 1991). Des mutations sur les résidus du grand T de polyome fixant le zinc abolissent l'oligomérisation et la réplication de l'ADN (Rose et Schaffhausen, 1995). Les deux hexamères dénaturent la région riche en purines/pyrimidines et changent la conformation des séquences A/T (Dean *et al.*, 1987; Borowiec et Hurwitz, 1988; Parson *et al.*, 1990). L'ATP est ensuite hydrolysé et grand T provoque la séparation complète des deux brins grâce à son activité hélicase. La protéine cellulaire RP-A se fixe à l'ADN monocaténaire et l'ouverture des deux brins permet l'entrée du complexe ADN polymérase α -primase (Stillman, 1989; Kenny *et al.*, 1989). L'ADN polymérase α s'associe avec l'antigène grand T pour initier la synthèse de l'ADN viral (Smale et Tjian, 1986; Dornreiter *et al.*, 1990).

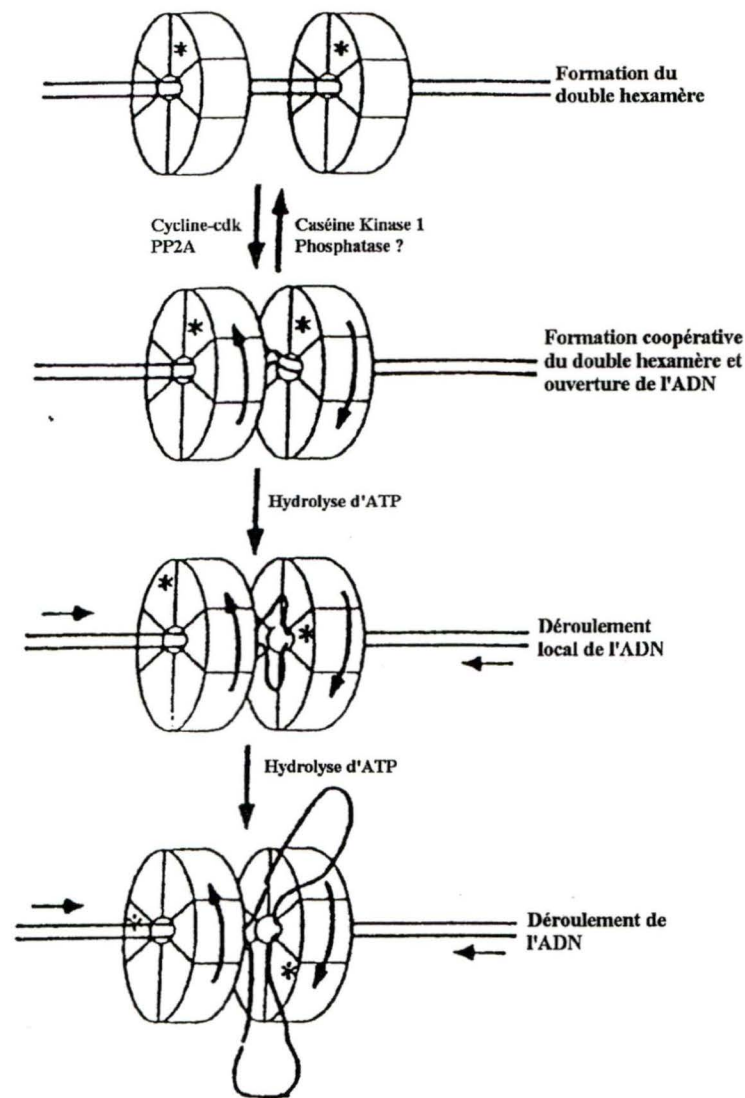


Figure 6. Modèle de l'initiation de la réplication virale de SV40. (Adaptation de Fanning, 1994). L'état de phosphorylation des antigènes T gouverne l'interaction hexamère-hexamère et le déroulement bidirectionnel de l'origine. Avant la réplication virale dans les cellules de mammifères infectées, l'antigène grand T peut s'assembler en double hexamère à l'origine de SV40. Toutefois, les hexamères ne peuvent interagir correctement entre eux pour dénaturer l'origine et permettre l'initiation de la réplication. Les hexamères actifs sont formés suite à la déphosphorylation de Ser 120 ou Ser 123 ou par phosphorylation de protéines nouvellement synthétisées sur Thr 124. L'hydrolyse d'ATP et une interaction dynamique entre les deux hexamères actifs conduit à un déroulement bidirectionnel de l'ADN et à l'initiation de la réplication.

Le poids moléculaire prédit de la protéine grand T est d'environ 86kDa. Alors que sur SDS-PAGE, elle apparaît aux environs de 100 kD. Cette différence dans la mobilité est largement due à des modifications post-traductionnelles. La protéine est hautement phosphorylée en N-terminal sur les résidus sérines et thréonines (Bockus et Schaffhausen, 1987a). Deux régions sont hautement phosphorylées, soit entre les résidus 80-180 et entre les résidus 267-278 dont les résidus phosphorylés ont été identifiés S267, S271, S274 et T278. Le niveau de phosphorylation de grand T est dépendant du stade de la croissance cellulaire (Bockus et Shaffhausen, 1987b). La phosphorylation de l'antigène grand T contrôle le niveau de son activité lors de l'initiation de la réplication virale (Prives, 1990). La protéine phosphatase 2A (PP2A) stimule la réplication virale en déphosphorylant les résidus sérine 120 et 123 de l'antigène grand T de SV40 (Virshup *et al.*, 1989; Scheidtmann *et al.*, 1991b). La phosphorylation de ces résidus semble empêcher certaines interactions entre les deux hexamères de grand T liés à l'origine de réplication (Virshup *et al.*, 1992). Ces interactions protéine-protéine seraient nécessaires pour la dénaturation de l'origine par grand T.

Les modifications post-traductionnelles ont été beaucoup plus étudiées chez le grand T de SV40. En plus d'être phosphorylé de façon comparable à grand T du virus du polyome, grand T de SV40 est glycosylé (Jarvis et Butel, 1985), acétylé (Mellor et Smith, 1978), adénylé (Bradley *et al.*, 1984) et ADP-ribosylé (Goldman *et al.*, 1981). Toutefois la signification de ces modifications n'est pas connue. Et même si de telles modifications n'ont pas été observée pour grand T du virus du polyome, cela n'empêche pas la possibilité de telles modifications.

Dans le processus de la carcinogenèse, l'antigène grand T permet l'immortalisation cellulaire, c'est-à-dire l'établissement de cellules primaires en culture (Rassoulzadegan *et al.*, 1983; Asselin et Bastin, 1985). Il complète l'antigène T moyen dans la transformation des cellules primaires et dans l'induction de tumeurs chez les rongeurs. L'antigène grand T active l'expression de plusieurs gènes cellulaires (Kingston *et al.*, 1986). Toutefois, cette propriété n'est pas suffisante pour induire l'immortalisation (Larose *et al.*, 1990). L'antigène grand T forme un complexe avec le produit du gène de la susceptibilité au rétinoblastome, *RB* (Dyson *et al.*, 1990). Cette association semble être importante pour l'immortalisation cellulaire. En effet, des mutants de grand T incapables de fixer la protéine RB n'immortalisent pas des cellules fibroblastiques d'embryon de rat (Larose *et al.*, 1991). Le gène *RB* est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire. Son inactivation, par mutation ou délétion, a été observée non seulement dans des rétinoblastomes mais aussi dans différents carcinomes humains (Lee *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 1988; Weinberg, 1990). Le produit du gène *RB* est une protéine de 110 kDa qui est phosphorylée durant certaines étapes spécifiques du cycle cellulaire (figure 7). RB est hypo-phosphorylé en G₁, et est phosphorylé avant l'entrée en phase S. Elle demeure phosphorylée jusqu'à tard en phase M où elle est déphosphorylée (Buchkovich *et al.*, 1989; DeCaprio *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1989; Ludlow *et al.*, 1989, 1993). La phosphorylation de la protéine RB ou sa fixation par grand T semble neutraliser sa propriété d'inhiber la croissance cellulaire. Plusieurs études suggèrent que RB, sous sa forme sous-phosphorylé, est un inhibiteur du facteur de transcription E2F (Chellappan *et al.*, 1991; Bagchi *et al.*, 1991; Weinberg, 1995). Ce facteur agit sur le promoteur de plusieurs gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (i.e. *fos*, *myc*) ou la régulation de la réplication de l'ADN (Mudryj *et al.*, 1990, 1991). La surexpression de E2F peut induire l'entrée en phase S des cellules quiescentes (Johnson *et al.*,

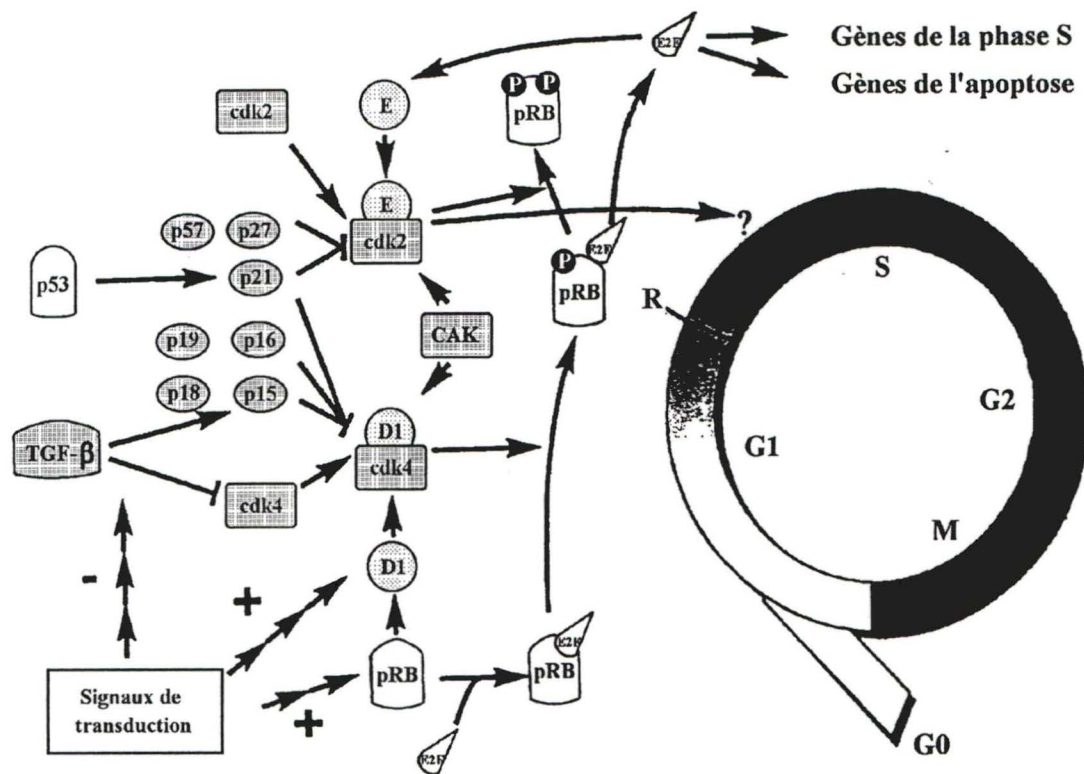


Figure 7. Régulation de la progression de la phase G₁/S dans les cellules de mammifères. (Tiré de Herwig et Strauss, 1997). Selon ce qui est connu, pRB est le régulateur principal du point de restriction (R) en G₁. En réponse à des mitogènes, Il y a une première phosphorylation de pRB par le complexe cycline D/Cdk4, entraînant le relâchement du facteur de transcription E2F et la transcription des gènes impliqués dans la phase S. De plus, la phosphorylation de pRB par le complexe cycline E/Cdk2 est requise pour la progression de la phase S. Une étape critique dans l'activation des complexes cyclines/Cdk est la phosphorylation par la "Cdk-activating" kinase (CAK). Les signaux inhibiteurs sont transmis par l'action de deux familles de protéines de peptides inhibiteurs (les familles INK4 et p21) qui lient et bloque l'activité des complexes cycline/Cdk.

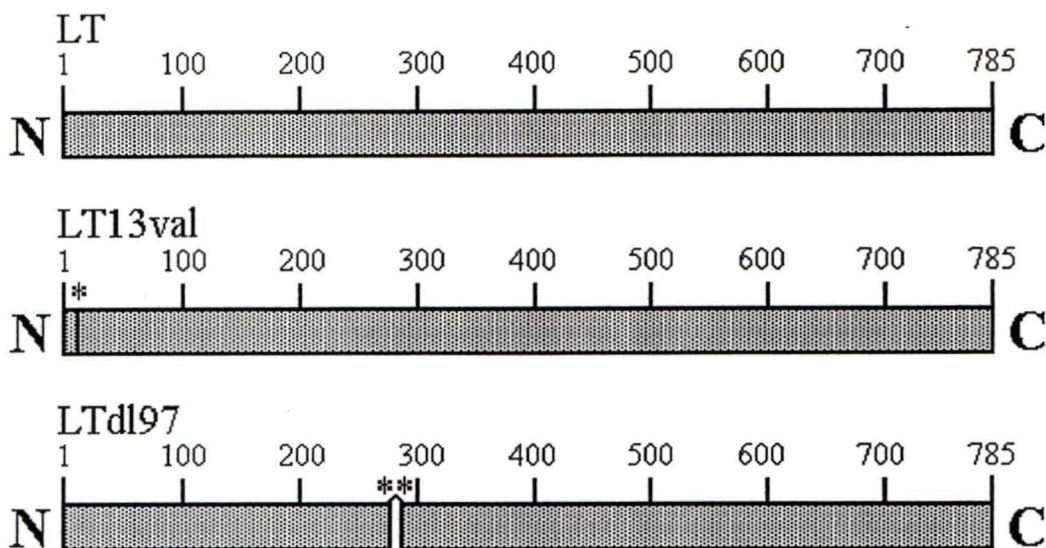
1993). L'antigène grand T dissocierait le complexe RB-E2F en fixant RB et permettrait au facteur E2F d'activer les gènes responsables de la prolifération cellulaire (Nevins, 1992). Il a été ainsi montré que grand T transactive le promoteur murin de la thymidine kinase par l'intermédiaire du motif de reconnaissance du facteur E2F. Cette transactivation implique que le site de liaison de grand T à RB soit intact (Ogris *et al.*, 1993).

L'antigène grand T est également impliqué dans l'intégration, l'amplification et l'excision des séquences virales dans le génome cellulaire (Botchan *et al.*, 1979; Pelligrini *et al.*, 1984; Bourgaux *et al.*, 1982) par des événements de recombinaison génétique.

Dans notre laboratoire, nous possédons des mutants de l'antigène grand T qui sont affectés dans la réplication virale. Les mutants en question sont LT13val (Larose *et al.*, 1991) et LTdl97 (figure 8); (Asselin *et al.*, 1986). LT13val possède une mutation ponctuelle à la position 13 où l'acide aminé leucine est changé en valine. Ce mutant lie l'origine et stimule faiblement la réplication. Il n'immortalise pas les cellules primaires et est recombinogène (Larose *et al.*, 1991; St-Onge et Bastin, 1993; Laurent *et al.*, 1995). Le mutant LTdl97 présente une délétion de 10 acides aminés entre les positions 270 et 280. Ce mutant peut lier l'origine. Il est inactif dans la réplication. Il n'est pas recombinogène et immortalise les cellules primaires (St-Onge et Bastin, 1993; Asselin *et al.*, 1986; Roberge et Bastin, 1988).

Le laboratoire de Schaffhausen a montré que grand T peut être séparé en deux domaines fonctionnels distincts (Holman *et al.*, 1994). Un domaine amino-terminal nommé NT pouvant immortaliser des cellules primaires et un domaine carboxy-terminal nommé CT (figure 4). Le domaine carboxy-terminal possède les fonctions impliquées dans la réplication

A.



B.

	Liaison à l'origine	Réplication	Immortalisation	Recombinaison
LT	+	+	+	+
LT13val	+	+/-	-	+
LTdl97	+	-	+	-

Figure 8. Caractéristiques des mutants de grand T affectés dans la réplication virale.

Description des mutants produits dans le laboratoire et affectés dans la réplication virale. A. Représentation schématique des mutants LT13val et LTdl97. LT13val possède une mutation ponctuelle (*) qui change l'acide aminé leucine à la position 13 en valine. LTdl97 présente une délétion(**) de 10 acides aminés entre les résidus 270 et 280. B. Capacité fonctionnelle des mutants LT13val et LTdl97, liaison à l'origine de réplication virale, réplication d'ADN portant l'origine de réplication, Immortalisation de cellules primaires et pouvoir recombino-gène.

attribuable à grand T. Gjorup et coll. (1994), ont observé que dans des cellules de souris NIH 3T3, le domaine carboxy-terminal présente une activité dans la réplication mais la présence du domaine amino-terminal stimule beaucoup cette activité. Ce serait l'état de la cellule qui gouvernerait le niveau d'activité répliquative de CT. Des cellules privées de sérum auraient un CT peu actif, tandis que des cellules en croissance présenteraient un CT actif. Pour des cellules privées de sérum, NT aurait la capacité d'entraîner les cellules en phase S. CT pourrait également être complété par d'autres gènes de virus oncogènes à ADN tels que E1A d'adénovirus et E7 de HPV 16.

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme de réplication des papovavirus, notre objectif a été de déterminer l'impact que possède le domaine amino-terminal de grand T du virus du polyome dans la réplication ainsi que de caractériser les mutants de grand T affectés dans leur capacité répliquative. Pour cela, nous avons effectué des essais de réplication *in vivo*. Ces essais permettent la complémentation de divers mutants de grand T. Nous avons observé que la mutation 13val abolit la capacité stimulatrice de l' amino-terminus de grand T et que LTdl97 est un mutant à caractère dominant négatif dans la réplication.

MATERIEL ET METHODES

I. Souche virale.

Les plasmides recombinants contiennent des séquences de la souche A2 du virus du polyome, un variant du type sauvage produisant de grandes plaques (Fried *et al.*, 1975).

II. Plasmides recombinants.

pPyLT1 (Treisman *et al.*, 1981) contient le génome viral du polyome cloné au site *Bam*HI de pAT 153 et n'encode que l'antigène grand T dû à une délétion spécifique de l'intron. Le défaut de réplication de pPyLTori- vient d'une délétion de 23 pb et de l'introduction d'un linker *Xho*I aux nt 37-60 (Bautch *et al.*, 1987).

pCMV-NT contient l'ADN complémentaire de grand T portant une mutation ponctuelle qui modifie le codon Glu260 (GAG) en codon STOP (TAG). Ce qui conduit à l'expression des 259 premiers acides aminés de grand T. Ce gène recombinant est sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus (CMV); (Gjorup *et al.*, 1994).

pCMV-CT présente la séquence codante de grand T pour les acides aminés 264 à 785. Ce gène recombinant est également sous l'influence du promoteur du cytomégalo virus (CMV); (Gjorup *et al.*, 1994).

11-63-72 contient l'ADNc de grand T et présente une triple mutation ponctuelle à l'intérieur de la structure en doigt de zinc: les mutations T1911C, A1963T et A1972T. Soit thymidine à la position 1911 du génome viral changée par la cytosine, l'adénosine 1963 changée en thymidine et l'adénosine 1972 changée en thymidine. Ces mutations conduisent à un changement d'acides aminés de grand T, Cys452Arg, His469Leu, His472Leu (Rose et Schaffhausen, 1995).

pPyLT13val ori- et pPyLT16val ori- contiennent des transversions C→G aux nucléotides 210 et 213 qui changent une leucine en valine aux positions 13 et 16 respectivement. Ces mutations inactivent la propriété d'immortalisation de grand T (Larose *et al.*, 1991).

pPyLT97 ou pPyLTdl97 encode un grand T mutant caractérisé par une délétion de 30pb entre les nucléotides 1367 et 1397. Ce mutant est déficient dans l'initiation de la synthèse d'ADN viral (Asselin *et al.*, 1986).

pPyLT141 ori- encode un grand T mutant ayant une délétion de 18 pb entre les nucléotides 978 et 996. Cette mutation a été créée par mutagenèse dirigée sur pPyLT1 (Larose *et al.*, 1990), il encode un antigène grand T inactif pour l'immortalisation et qui est incapable de fixer le produit du gène de la susceptibilité au rétinoblastome (Larose *et al.*, 1991)

pPLCAT possède l'origine de réplication du virus du polyome, nucléotides 5006 à 168, ainsi que le gène codant pour l'enzyme acétyltransférase du chloramphénicol sous le contrôle du promoteur tardif du virus du polyome.

A10-E2F-CAT possède le gène codant pour l'enzyme acétyltransférase du chloramphénicol sous le contrôle de la séquence -85 à -30 du promoteur E2 d'adénovirus et du promoteur minimal de SV40. L'enhancer de E2 d'adénovirus contient 2 éléments E2F (Howes *et al.*, 1996).

pAT 153 dérive du vecteur pBR322. Il présente une délétion de 704pb entre les nucléotides 1648 à 2352 de pBR322.

III. Méthodes de clonage.

Les digestions d'ADN à l'aide d'enzymes de restriction sont effectuées selon les recommandations des manufacturiers (Amersham, Bethesda Research Laboratories, Pharmacia, Promega, New England Biolabs). La purification des fragments d'ADN se fait par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % suivie d'une purification par matrice SephaglasTM selon les directives du fabricant (Pharmacia).

Les ligations intramoléculaires et intermoléculaires procèdent à 16°C pendant 16 à 20 heures dans 15µl de tampon de ligation (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP) contenant 2 unités d'ADN ligase de T4. Les transformations bactériennes sont effectuées dans la souche DH5α. L'amplification et l'extraction de plasmides

recombinants sont effectuées selon le protocole décrit dans le livret d'instruction de la compagnie QIAGEN (QIAGEN Plasmid Handbook, 1995).

i) Préparation des bactéries compétentes.

Le protocole de la préparation de bactéries compétentes DH5 α est celui décrit dans Maniatis et coll. (1982) pour la transformation de *E.coli* χ 1776.

ii) Transformation des bactéries compétentes.

Une quantité d'environ 100 ng d'ADN est mis en présence de 100 μ l de bactéries compétentes sur glace pendant environ 10 minutes. Les bactéries sont ensuite soumises à un choc thermique à 42°C pendant 90 secondes, puis placées sur glace pendant 1 à 2 minutes. Par la suite, 4 volumes (400 μ l) de milieu de culture LB est-ajouté et le tout incube à 37°C durant 1 heure avec agitation. Cette culture est centrifugée à 3000 rpm dans une microcentrifugeuse et inversée pour enlever l'excédent de milieu. Les cellules sont resuspendues dans ce qui reste de milieu (environ 50 μ l) et sont étendues sur boîte de Pétri contenant du LB-agar (1.5 g agar pour 100 ml de LB) contenant 100 μ g/ml d'ampicilline. On utilise l'antibiotique ampicilline comme agent de sélection pour nos plasmides recombinants. On incube alors à 37°C durant 18 h, pour qu'il y ait formation de colonies.

iii) Analyse des colonies recombinantes.

L'analyse des colonies recombinantes se fait par la technique de mini-lyse alcaline. Cette technique permet la digestion de l'ADN purifié, et ainsi facilite son analyse. Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par Maniatis et coll. (1982), et celui décrit par Chowdhury (1991) ainsi que la méthode d'extraction de plasmides de QIAGEN (QIAGEN Plasmid Handbook, 1995).

Les colonies sélectionnées sont cultivées durant 16 à 20 h à 37°C dans 5 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Un volume de 1.5 ml est microcentrifugé à 5000 rpm pour 1 minute. Le culot est resuspendu dans 150 µl du tampon P1 froid de QIAGEN. La lyse cellulaire s'effectue par l'ajout de 150 µl de tampon P2 de QIAGEN. Le tube est inversé 4 à 5 fois avant d'incuber 5 minutes à la température pièce. Par la suite, 150 µl de tampon P3 froid de QIAGEN est ajouté et mélangé par inversion. Le tube est placé sur glace durant 5 minutes. Les débris cellulaires sont éliminés par l'ajout de 500 µl de phénol-chloroforme 1:1 et d'une centrifugation de 5 minutes à 13000 rpm. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et une précipitation d'ADN est effectuée telle que décrite dans Maniatis et coll. (1982). Le culot est resuspendu dans 20 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) additionné de ribonucléase A à 20 µg/ml (Pharmacia) et incubé 30 minutes à 37°C. L'analyse de la colonie peut s'effectuer par une digestion enzymatique ou l'ADN peut être déposé directement sur un gel d'agarose. Les cellules de la colonie d'intérêt peuvent être congelées à -80°C suite à l'addition de glycérol à la culture bactérienne (pour obtenir entre 35 et 50% de glycérol).

iv) Production de l'ADN.

L'ADN utilisé en laboratoire est produit à l'aide de la méthode d'extraction de plasmide de QIAGEN selon les recommandations du fabricant.

IV. Culture cellulaire.

Les cellules sont mises en culture dans du milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de fongicide (amphotéricine B, 2.5 µg/ml) et 1% d'antibiotique (streptomycine 0.01%, pénicilline 100 unités/ml), milieu DMEM complet. Les cellules sont incubées à 37°C sous une atmosphère d'air contenant 5% de CO₂.

Le passage des cellules en culture s'effectue par traitement à la trypsine. Le tapis cellulaire est lavé avec de la versène (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 0.7 mM EDTA, 0.0015% rouge de phénol, pH 7.0) avant d'être traité à la trypsine (versène additionné de 0.06% trypsine) durant environ une minute, les cellules sont alors resuspendues par agitation et une fraction (1/3 à 1/10) des cellules est remise en culture dans du milieu DMEM complet frais.

La congélation des cellules à -80°C ou dans l'azote liquide s'effectue à raison de deux à trois millions de cellules dans un vial à congélation (environ 1 ml de DMEM + 20% SVF + 10% DMSO).

i) Clonage des lignées NIH3T3, FR3T3.

Les cellules NIH3T3 et FR3T3 proviennent respectivement de cellules de fibroblastes de lignée établie provenant de souris et de rat. Le clonage de ces lignées est effectué en passant les cellules à dilution 1/1000 dans un Linbro de 96 puits (7mm). On sélectionne les puits qui ne contiennent qu'une seule cellule et l'on attend qu'il y ait confluence dans le puits. Les cellules sont alors transférées dans des contenants de plus grande surface.

ii) Fibroblastes d'embryons de souris: préparation des cellules.

Les embryons de souris Balb/c de 13-14 jours sont prélevés stérilement, coupés, lavés trois fois au Tris salin (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 5 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 0.0015% [v/v] rouge phénol, pH 7.4) puis traités avec de la trypsine 0.06% (75 ml Tris salin + 25 ml trypsine 0.25% [p/v]) à 37°C avec agitation constante pendant 20 minutes. Les cellules sont filtrées à travers une gaze et sont recueillies dans 30 ml de sérum de veau foetal pour inactiver la trypsine. Cet extrait cellulaire est centrifugé à 1800 rpm pendant 10 minutes à 4°C et les cellules sont resuspendues dans un milieu DMEM complet puis comptées au bleu de Trypan. Dix millions de cellules sontensemencées par Pétri de 100 mm dans du DMEM complet puis sont incubées à 37°C pendant 20 à 24 heures, leur permettant d'atteindre de 30 à 50% de confluence.

V. Transfection des cellules en culture.

La transfection des cellules en culture s'effectue selon la méthode polybrène DMSO (Kawai et Nishizawa, 1984) pour les essais de réplication et selon la méthode à la LipofectAMINETM Reagent (Gibco BRL) pour les essais de transactivation de promoteurs par l'antigène grand T.

i) Transfection selon la méthode au polybrène-DMSO.

Un pétri de 100 mm contenant 7×10^5 cellules est incubé pendant 18-24 heures à 37°C puis vidé de son milieu nutritif et rincé une fois avec du milieu DMEM contenant 10% de SVF. L'ADN pour la transfection (1 µg de pPLCAT et 5 µg du/des plasmide(s) recombinant(s) LT, pour un essai de réplication) est ajouté aux cellules dans 2 ml de DMEM avec 10% SVF et 30 µl de polybrène (1 mg/ml dans tampon PBSA). Le tout incube pendant 6 heures à 37°C, 5% CO₂, avec agitation occasionnelle. Le milieu est enlevé puis 4 ml de DMEM contenant 15% (NIH3T3) ou 25% (cellules embryonnaires de souris et FR3T3) de DMSO sont ajoutés dans le Pétri. Le DMSO est mis en présence des cellules respectivement 30 secondes, 60 secondes et 4 minutes pour les cellules NIH3T3, cellules embryonnaires de souris et FR3T3. Le Pétri est ensuite rincé 2 fois avec du milieu DMEM, afin d'éliminer le DMSO, et 10 ml de milieu DMEM complet sont ajoutés. Les cellules sont alors incubées à 37°C pendant 48 heures.

ii) Transfection à la LipofectAMINE™ Reagent.

La transfection à la LipofectAMINE™ Reagent pour l'essai de transactivation de promoteurs s'effectue selon les recommandations du manufacturier GibcoBRL. Pour résumer, $1-3 \times 10^5$ cellules sontensemencées dans 2 ml de milieu DMEM complet par puits d'un Linbro de six puits. Les cellules incubent à 37°C et 5% CO₂ jusqu'à 50-80% de confluence, soit de 18 à 24 heures. Les solutions de transfections A (1.5 µg de E2FA10CAT et 1.5 µg du plasmide recombinant LT dans 100 µl de milieu DMEM sans sérum) et B (5µl de LipofectAMINE™ Reagent dans 100 µl de DMEM sans sérum) sont combinées et incubé à la température pièce pendant 15-45 minutes pour permettre la formation de complexes liposomes-ADN. Les cellules sont rincées avec 2 ml de DMEM et le mélange AB + 800 µl de DMEM est déposé sur les cellules. Les cellules incubent avec le complexe durant 5 heures à 37°C et 5% CO₂. Suite à cette incubation, 1 ml de DMEM contenant 20% de SVF est ajouté au milieu. Le milieu est remplacé par du milieu frais 24 heures suivant le début de la transfection. Les cellules incubent alors 24 heures de plus à 37°C et 5% CO₂.

VI. Détermination *in vivo* de l'efficacité de réplication de l'ADN recombinant.

i) Extraction de l'ADN épisomique des lignées NIH3T3, FR3T3 et cellules embryonnaires de souris.

L'ADN épisomique est extrait des cellules selon la procédure d'extraction d'ADN de faible poids moléculaire de Hirt (1967). Quarante-huit à soixante-douze heures après la transfection au polybrène-DMSO, les cellules sont lavées au moins deux fois avec 5 ml de

tampon PBSA (0.17 M NaCl, 3.3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 6.8). La lyse cellulaire est provoquée par l'addition de 0.7 ml de solution de Hirt (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.6% [p/v] SDS). Après incubation de 10 minutes à la température pièce, le lysat cellulaire est recueilli dans un tube de 1.5 ml à l'aide d'un policeman et la molarité est ajusté à 1 M NaCl à l'aide d'une solution 5 M NaCl. Les échantillons sont mélangés par inversion puis conservés à 4°C pendant une nuit. Le lendemain, ils sont centrifugés pendant 30 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires et l'ADN chromosomique. L'ADN épisomique est purifié par des extractions successives au phénol, phénol-chloroforme 1:1 et chloroforme-alcool isoamylique 24:1. L'ADN est ensuite précipité à l'aide d'un volume d'isopropanol 100% et lavé avec de l'éthanol 70% pour éliminer les sels. Pour terminer, l'ADN est resuspendu dans 200 µl de tampon TE.

ii) Mesure indirecte de l'efficacité de réplication de l'ADN recombinant (Muller *et al.*, 1983).

Pour évaluer l'efficacité de réplication de l'ADN recombinant dans les cellules de rat et de souris, l'état de méthylation de l'ADN épisomique est étudié à l'aide des enzymes de restriction *DpnI* et *BclI*. L'enzyme *DpnI* élimine l'ADN utilisé lors de la transfection tandis que *BclI* linéarise l'ADN répliqué. L'ADN utilisé lors de la transfection provient d'une souche *E.coli* qui possède une dam méthylase. Cette méthylase introduit un groupement méthyl à la position N⁶ des résidus adénines. L'enzyme *DpnI* coupe l'ADN seulement si les résidus adénines sont méthylés tandis que l'enzyme *BclI* ne coupe pas si l'ADN est méthylé. L'ADN répliqué dans les cellules de souris ou de rat est hémiméthylé ou non-méthylé car les

cellules de mammifères ne possèdent pas de dam méthylase. Donc, l'ADN répliqué n'est pas coupé par l'enzyme *DpnI* et est linéarisé par l'enzyme *BclI*.

L'ADN extrait selon la méthode de Hirt est digéré avec l'enzyme *BclI* pendant 4 heures à 50°C. L'enzyme est ensuite éliminée par une extraction au phénol-chloroforme 1:1 et l'ADN est précipité avec de l'isopropanol 100% et lavé à l'éthanol 70%. L'ADN est ensuite resuspendu dans 45 µl d'eau et digéré avec l'enzyme *DpnI* pendant 6 heures à 37°C. Les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Le gel est ensuite coloré dans une solution de bromure d'éthidium 2 µg/ml pour visualiser l'ADN sous lumière ultraviolette. L'ADN est par la suite transféré sur une membrane de Nylon pour être hybridé avec une sonde radioactive CAT.

iii) Préparation d'une sonde d'ADN radioactive.

La sonde est préparée à l'aide du système "Multiprime DNA labelling" développé par Feinberg et Vogelstein (Feinberg et Vogelstein, 1983; Feinberg et Vogelstein, 1984) et commercialisé par Amersham. Cette technique implique le marquage d'une séquence d'ADN simple brin par le fragment Klenow de l'ADN polymérase I de *E. coli*. Le plasmide (pCAT-Basic vector, Promega), qui contient la séquence d'ADN CAT désirée, est digéré par les enzymes de restriction appropriés, *XbaI* et *NcoI*, les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Le fragment d'ADN (563 pb) utilisé comme sonde est extrait de l'agarose par électroélution (Maniatis *et al.*, 1982). La réaction de marquage est effectuée dans le mélange suivant: 15 à 25 ng du fragment d'ADN préalablement dénaturé 5 minutes à 100°C; 5 µl d'un tampon contenant les déoxyribonucléotides dGTP, dATP et

dTTP; 2.5 µl d'un tampon contenant des amorces aléatoires; 2.5 µl de [α - 32 P]-dCTP (10 µCi/µl, Amersham); de l'eau distillée est ajoutée de façon à compléter le mélange à un volume final de 25 µl et 1 µl du fragment Klenow de l'ADN polymérase I de *E. coli*. La réaction procède pendant 2 à 3 heures à la température de la pièce. La sonde peut alors être conservée à -20°C.

iv) Transfert de l'ADN sur membrane de Nylon (*Southern blotting*).

Les techniques utilisées pour le transfert du produit des digestions enzymatiques sur membrane de Nylon sont celles décrites par Southern (Southern, 1975) ainsi que dans le manuel d'instruction du procédé commercialisé par Pharmacia de transfert par application de vide, "VacuGeneTM XL Vacuum blotting System".

a. Technique Southern.

Le gel est trempé pendant 40 minutes à la température de la pièce avec agitation constante dans une solution dénaturante (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) pour être ensuite placé dans une solution neutralisante (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.2, 1 mM EDTA) pendant 40 minutes. La solution neutralisante est renouvelée après 20 minutes. Le transfert de l'ADN se fait par capillarité sur une membrane de Nylon Hybond-N (Amersham) en présence d'une solution 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M citrate de sodium, pH 7.5). Le montage utilisé est celui décrit par Maniatis et coll. (1982). Après 18 heures de transfert, la membrane est séchée pendant 2-3 heures sous vide à 80°C afin de permettre la fixation de l'ADN.

b. Technique VacuGene™ XL Vacuum blotting System (Pharmacia).

Ce système développé par Pharmacia permet le transfert sur membrane de fragments d'ADN et d'ARN séparés par électrophorèse sur gel d'agarose en une heure par application de vide à basse pression. L'utilisation de cet appareil, combiné à un transfert alcalin sous vide de l'ADN permet une économie de temps car l'étape de dénaturation, de transfert et de séchage à 80°C de la technique de Southern sont réduites ou ne sont plus nécessaires. L'utilisation d'une membrane Hybond-N+ (Amersham) lors de cette technique permet la fixation des acides nucléiques à la membrane lors du traitement alcalin puisque la membrane est chargée positivement. Le protocole utilisé ainsi que le montage est celui décrit dans le manuel d'instruction du VacuGene™ XL Vacuum blotting System (Pharmacia) ainsi que selon les recommandations d'Amersham pour le transfert alcalin sur ses membranes Hybond-N+. Brièvement, suite à la coloration du gel dans une solution de bromure d'éthidium 2 µg/ml le transfert peut s'affectuer. Le gel est placé sur la membrane de Nylon Hybond-N+ préalablement trempée dans de l'eau distillée. Un vide de 30 à 50 mbar est appliqué et une quantité de solution dénaturante (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) suffisante pour recouvrir le dessus du gel est maintenue tout au long du transfert de 10 minutes. La solution dénaturante est remplacée par une solution alcaline (0.4 M NaOH). Un vide de 30-50 mbar est appliqué en permanence avec en tout temps un volume suffisant de la solution alcaline sur le gel durant le transfert de 40 à 60 minutes. Suite à ce transfert la membrane de Nylon est rincée dans du 5X SSC, durant une minute.

v) Préhybridation et hybridation de la membrane de Nylon.

Afin d'éviter l'attachement non-spécifique de la sonde radioactive, la membrane est préalablement incubée pendant 3 à 4 heures avec agitation constante à 68°C dans un sac de plastique scellé contenant 20 à 25 ml d'une solution de préhybridation (120 mM Tris-HCl pH 7.4, 600 mM NaCl, 8 mM EDTA, 1% [p/v] Tétrasyodium pyrophosphate, 0.2% [p/v] SDS, 100 µg/ml héparine (Sigma)). La membrane est ensuite incubée pendant 18 heures à 68°C dans 12 ml d'une solution d'hybridation (120 mM Tris-HCl pH 7.4, 600 mM NaCl, 8 mM EDTA, 1% [p/v] tétrasodium pyrophosphate, 0.2% [p/v] SDS, 100 µg/ml héparine (Sigma), 10% [p/v] sulfate de dextran) contenant la sonde radioactive. La sonde est préalablement dénaturée avec 0.1 volume de 1 N NaOH pendant 5 minutes à 37°C. Pour éliminer la radioactivité retenue de façon non-spécifique sur la membrane, un lavage est effectué à la température de la pièce dans du 2X SSC pendant 20 minutes suivi d'un autre lavage à 68°C avec agitation constante dans une solution 0.1X SSC, 0.2% [p/v] SDS pendant 90 minutes. La membrane est ensuite rincée dans du 0.1X SSC à la température de la pièce durant 2 minutes. La membrane est ensuite séchée et exposée sur écran phosphorIMAGER (Molecular Dynamics) ou exposée à -80°C sur un film Kodak XAR-5.

VII. Transactivation de promoteurs par l'antigène grand T.

i) Extraction des protéines des cellules transfectées.

L'essai transitoire à l'acétyltransférase du chloramphénicol s'effectue essentiellement selon la méthode décrite par Gorman et coll. (1982). Quarante-huit heures après la

transfection à la LipofectAMINE™ Reagent, les cellules sont lavées 3 fois avec une solution de PBSA (0.17 M NaCl, 3.3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 6.8). Un ml d'une solution Tris-EDTA-NaCl, T-E-N, (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7.4) est ajouté aux cellules et est placé sur glace durant 5 minutes. Les cellules sont ensuite récoltées dans un tube de 1.5 ml. Les cellules sont alors centrifugées pendant 2 minutes à 4°C. Après avoir resuspendu les cellules dans 100 µl d'une solution de 250 mM Tris-HCl pH 7.4, la lyse cellulaire s'effectue par trois cycles gels-dégels (5 minutes glace sèche/méthanol, 5 minutes 37°C) consécutifs. Le lysat est alors centrifugé 5 minutes à 4°C puis le surnageant est transféré dans un nouveau tube. La concentration totale des protéines contenues dans le surnageant est évaluée au moyen du réactif BCA (Pierce Laboratories) afin que chaque essai CAT soit conduit avec une quantité équivalente de protéines.

ii) Réaction enzymatique.

Dans un tube de 1.5 ml, le volume de surnageant requis (préalablement chauffé à 65°C pendant 10 minutes) est additionné de: 0.1 µCi de [¹⁴C]-chloramphénicol (50 mCi/mole; Amersham), 20 µl d'une solution d'acétyl coenzyme A (4mM acétyl CoA, Tris-HCl 0.25 M, pH7.4) et le volume nécessaire d'un tampon Tris-HCl 0.25 M, pH 7.4, pour obtenir un volume total de réaction de 180 µl. La réaction enzymatique est incubée à 37°C pendant 18 heures. On ajoute 10 µl d'une solution d'acétyl coenzyme A (4 mM acétyl CoA, Tris-HCl 0.25 M, pH7.4) 2 heures après le début de la réaction enzymatique. L'arrêt de la réaction se fait par l'ajout de 600 µl d'acétate d'éthyle.

iii) Extraction et chromatographie.

Le chloramphénicol et ses formes acétylées sont extraits du mélange réactionnel par l'acétate d'éthyle. La phase organique est recueillie et évaporée puis le chloramphénicol et ses formes acétylées sont resuspendus dans 20 µl d'acétate d'éthyle et déposés sur une plaque chromatographique recouverte de gel de silice. Les produits de la réaction d'acétylation sont séparés par une chromatographie dans un mélange de chloroforme-méthanol (95:5) pendant environ 20 minutes. La plaque est alors exposée sur un écran phosphorIMAGER (Molecular Dynamics), pour déterminer l'activité enzymatique de la conversion du chloramphénicol en produits acétylés, ou sur film Kodak XAR-5.

VIII. Isolation d'ADNc de kinases cellulaires dans les cellules NIH3T3.

Afin de déterminer si l'amino-terminus de grand T stimule l'expression d'une kinase associée à la phosphorylation de grand T ou au cycle cellulaire, nous avons procédé à une approche visant à produire des ADNc de kinases eucaryotes de type sérine/thréonine par RT-PCR (Hanks et Lawton, 1993).

i) Transfection des cellules NIH3T3.

Les cellules NIH3T3 SC1 et M6 ont été transfectées par la méthode au polybrène-DMSO, à raison de 10 µg de pCMV-NT par Pétri de 100 mm contenant 6.5×10^5 cellules.

ii) Extraction de l'ARN total par TRIzol®Reagent (Gibco BRL).

L'ARN des cellules transfectées par pCMV-NT est extrait par le produit TRIzol®Reagent de Gibco BRL selon les recommandations du manufacturier. L'ARN est mis sur gel et dosé au spectrophotomètre à 260 et 280 nm pour vérifier de sa qualité. Un traitement à l'ADNase peut être effectué pour éliminer l'ADN contaminant la préparation. Le traitement à l'ADNase a lieu dans 50 µl à 37°C durant 30 minutes dans un tampon 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 6 mM MgCl₂ additionné de 0.5 µl de RNAGuard (Pharmacia) et 2 µl de DNAaseI (Pharmacia). Suite à la réaction l'ARN est purifié par une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamyl 25:24:1 et précipité à l'isopropanol. L'ARN est dissout dans de l'eau traité au DEPC. L'ARN est alors remis sur gel et dosé à nouveau au spectrophotomètre à 260 et 280 nm pour vérifier de sa qualité et de sa concentration.

iii) Réaction de transcription inverse.

La réaction de transcription inverse s'effectue comme suit à l'aide d'un trousseau de transcription inverse de Gibco BRL. L'ARN total, 5 µg, est chauffé dans 13 µl d'eau à 80°C durant 3 minutes. Le tube est refroidi rapidement sur glace et centrifugé 5 secondes. Les composés de la transcription inverse sont ajoutés au tube: 4 µl First Strand Buffer 5X, 2 µl 0.1 mM DTT, 1 µl 1 mM dNTP mix (contient 250 µM de chaque dNTP), 0.5 µl 10 µM Q35 (amorce 5'-GAG GAC TCG AGT CTA AGC TTT TTT TTT TTT TT-3'), 0.25 µl de RNAGuard (Pharmacia). L'ajout de 1 µl de Superscript II RT (200 unités) (Gibco BRL) initie la réaction. La réaction procède comme suit: 5 minutes à la température de la pièce, 1 heure à 42°C, 10 minutes à 50°C. L'enzyme est ensuite inactivée par un traitement de 15

minutes à 70°C. Un volume de 1.5 µl de RNAase H (1.5 unités) (Pharmacia) est ajouté et le tube placé à 37°C pour détruire la matrice ARN. La réaction est diluée à 1 ml avec TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) et conservé à 4°C (Pool 3'-ADNc).

iv) Réaction de PCR.

La réaction de PCR s'effectue à l'aide de l'enzyme AmpliTaq (Pharmacia). La réaction se déroule comme suit sur 1 µl du Pool 3'-ADNc à l'aide des amorces suivantes: Q1, 5'-GAG GAC TCG AGC TCA AGC-3' et VIB, 5'-YAY MGN GAY HTN AAR CC-3'. VIB est une séquence dégénérée qui code pour le consensus Y/H-R-D-L/I-K-P du sous-domaine VIB de la région catalytique des kinases du type sérine/thréonine (Hanks et Lawton, 1993). Dans 50 µl de volume final, 1 µl du Pool 3'-ADNc est mélangé avec 10 µl de 10 µM VIB, 1 µl 10 µM Q1, 1.25 µl 10 mM dNTP, 5 µl tampon de PCR 10X, et 0.5 µl d'ampliTaq (Pharmacia). Les conditions de PCR standard utilisés sont: dénaturation à 95°C pour 3 minutes; 30 cycles à 94°C 1 minute, 55°C 1 minute, 72°C 3 minutes; 72°C 15 minutes. La réaction de PCR est mise sur gel d'agarose et l'ADN est purifié par Sephaglas™ Band Prep kit (Pharmacia).

v) Incorporation du produit de PCR dans le vecteur pBluescript SK+.

L'ADN produit lors d'un PCR présente souvent une adénosine due à la forte préférence de la polymérase pour le dATP (Marchuk *et al.*, 1990). Le plasmide pBluescript SK+ (Stratagene) est alors digéré par *EcoRV* et incubé avec la polymérase (AmpliTaq de Pharmacia) (1 unité/µg de plasmide/20 µl volume de réaction) dans un tampon 50 mM KCl,

10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 200 µg/ml BSA en présence de 2 mM dTTP durant 2 heures à 70°C. L'absence des autres nucléotides dans la réaction résulte en l'addition du nucléotide thymidine à l'extrémité 3' de chaque fragment. Après une extraction au phénol et une précipitation, le vecteur est utilisé pour le clonage du produit de PCR purifié. La méthode de ligation utilisée est celle décrite précédemment. Il en est de même pour la transformation des bactéries compétentes. Les cellules sont étalées sur LB-agar dans des Pétri de 100 mm (100µl de 2% X-Gal et 40µl d'IPTG 100mM ont été étendus sur l'agar) et incubées à 37°C. Les colonies blanches sont recueillies pour l'analyse.

vi) Détermination de la séquence nucléotidique de l'ADN.

L'ADN provenant des colonies blanches a été analysé par séquençage en utilisant la méthode de Sanger (1977) à l'aide d'un trousseau de séquençage produit par Pharmacia et qui utilise l'ADN polymérase T7. Les séquences ont été produites à partir des amorces T3 et T7 orientées de part et d'autre du site de restriction *EcoRV* de pBluescript SK+. Les portions de séquences obtenues ont été par la suite soumises à Genbank.

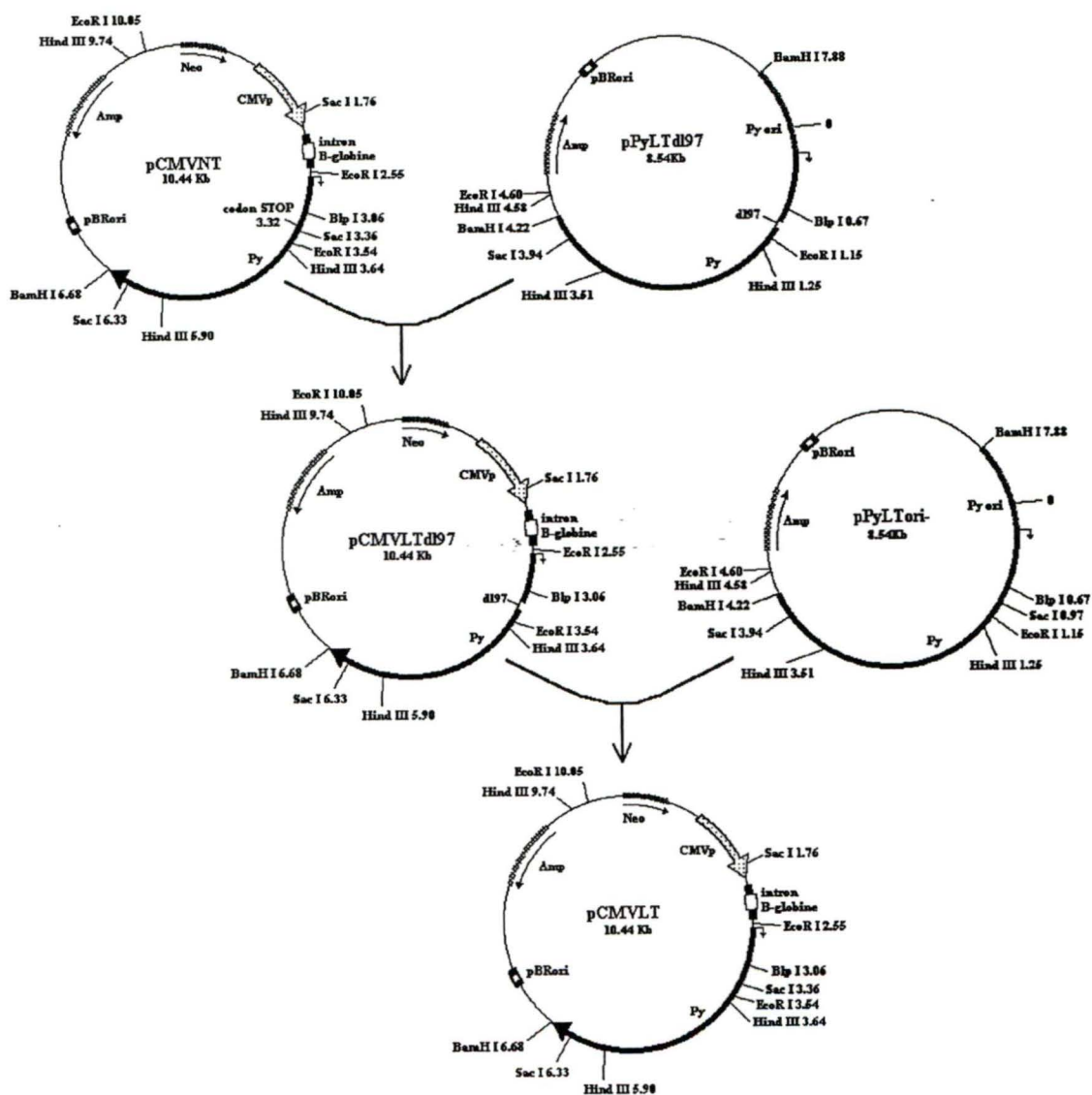
RÉSULTATS

I. Activité répliquative du domaine carboxy-terminal (CT) et complémentation par le domaine amino-terminal (NT) de grand T (LT).

1. Construction du vecteur d'expression de LT sous le promoteur CMV.

Les vecteurs d'expression des domaines carboxy et amino-terminaux de grand T sont sous le contrôle du promoteur CMV (Gjorup *et al*, 1994). Ils sont désignés pCMV-NT et pCMV-CT. La mutation dl97 du plasmide pPyLTdl97 est transféré dans ce type de vecteur pour obtenir le vecteur pCMV-LTdl97. Le fragment *BlnI-BamHI* de 3.55Kb, contenant la mutation dl97, a été transféré dans pCMV-NT (figure 9). Ce transfert permet l'élimination du codon STOP de pCMV-NT et l'intégration de la mutation dl97. L'analyse du recombinant est facilitée par l'absence d'un site *SacI* dans la délétion de la mutation dl97. Le fragment *BlnI-BamHI* de pPyLT1ori- a également été transféré dans pCMV-LTdl97 pour obtenir le vecteur pCMV-LT. De cette façon, le site de restriction, *SacI*, est retrouvé, ce qui facilite encore l'analyse des recombinants.

A.



B.

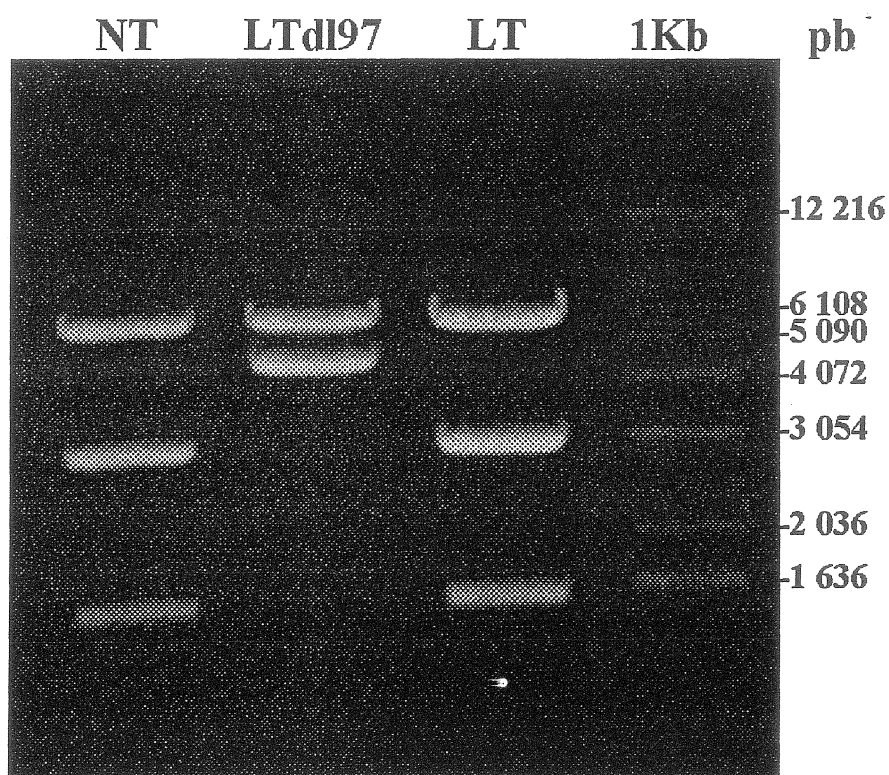


Figure 9. Construction des vecteurs pCMV-LTdl97 et pCMV-LT. A. Procédure de clonage pour la construction des vecteurs pCMV-LTdl97 et pCMV-LT. Le transfert du fragment *B**l**p**I*_{0.67}-*B**a**m**H**I*_{4.22} de pPyLTdl97 dans pCMV-NT forme le vecteur pCMV-LTdl97. Par la suite, le transfert du fragment *B**l**p**I*_{0.67}-*B**a**m**H**I*_{4.22} de pPyLTori- dans pCMV-LTdl97 forme le vecteur pCMV-LT. B. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% de la digestion par *S**a**c**I* des recombinants obtenus (~1µg d'ADN), coloration au bromure d'ethidium. 1Kb, 1Kb ladder (Gibco BRL); NT, pCMV-NT; LTdl97, pCMV-LTdl97; LT, pCMV-LT.

2. Efficacité répliquative de CT dans différents types cellulaires.

Afin de déterminer les restrictions pouvant mener à une diminution de l'activité répliquative du domaine carboxy-terminal de grand T, nous avons déterminé, *in vivo*, l'efficacité répliquative de CT dans différents types cellulaires. Les essais ont été conduits dans des cellules de fibroblastes de rats FR3T3, dans des cellules fibroblastiques de souris NIH 3T3 et dans des cellules embryonnaires de souris.

2.1. Réplication dans des cellules de rats FR3T3.

Les cellules de rats sont reconnues comme étant semi-permissives au virus du polyome (Tooze, 1981). Elles permettent un certain niveau de réplication du génome viral. L'efficacité répliquative du domaine carboxy-terminal de grand T a été déterminée *in vivo* dans ces cellules ainsi que le potentiel d'activation que possède le domaine amino-terminal. Des sous-clones de la lignée établie FR3T3 ont été utilisés. Ce sont les sous-clones FR3T3 SCB et FR3T3 SC20c2. Les cellules ont été ensemencées dans des Pétris à raison de 800 000 cellules par Pétri de 100mm et à raison de 3 Pétris par échantillon. Les vecteurs exprimant LT, CT et NT ont été transfectés avec le plasmide rapporteur pPLCAT par la méthode du polybrène-DMSO à raison de 1µg pPLCAT et 5µg des vecteurs T. Le plasmide rapporteur possède l'origine de réplication du virus du polyome ainsi que le gène codant pour l'acétyltransférase du chloramphénicol (CAT). La réplication du plasmide est révélée grâce à une sonde radioactive spécifique pour les séquences du gène CAT. La digestion de l'ADN de faible poids moléculaire, isolé des cellules transfectées, par les enzymes de restriction *Bcl*I et *Dpn*I permet de distinguer entre l'ADN qui a été répliqué de l'ADN qui a été transfecté. L'ADN

répliqué sera résistant à une digestion par *DpnI*, ce qui n'est pas le cas pour l'ADN transfecté. Le taux d'activité répliquative se mesure en pourcentage, selon l'activité de grand T de type sauvage par dosage au phosphorIMAGER (Molecular Dynamics). La figure 10A montre que CT n'est pas très actif dans les deux sous clones, (environ 3% de l'activité de LT) et que l'addition de NT n'a qu'un modeste effet, de 6 à 13% de l'activité de LT (tableau 1).

2.2. Réplication dans des cellules de souris NIH 3T3.

Les essais de réplication décrits par le laboratoire de Schaffhausen ont été effectués dans des cellules NIH 3T3 (Gjorup *et al.*, 1994). Nous n'avons pas obtenu le même niveau d'activité de CT que ce groupe dans la lignée NIH 3T3. Nous avons alors sous-cloné la lignée NIH 3T3 pour déterminer si l'effet observé est propre à la lignée ou à une minorité de cellules. La lignée NIH 3T3 étant composée de cellules hétérogènes, le sous-clonage permet d'obtenir des lignées cellulaires dont toutes les cellules sont identiques (population homogène) à faible niveau de passages puisque la lignée est ainsi établie à partir d'une cellule unique. Si dans la lignée NIH 3T3 il y a une minorité de cellules qui permettent un fort taux de réplication par CT, elles seraient à elles seules responsables de l'activité répliquative de CT observée. Le sous-clonage nous permettra alors de déterminer si le niveau réduit de réplication dans la lignée NIH 3T3 est attribuable à toute les cellules de la lignée, ou dépend de la quantité de cellules pouvant supporter la réplication de CT.

La figure 10C et le tableau 1 montrent que l'activité répliquative de CT varie d'un sous-clone à l'autre. Dans aucun cas l'activité n'atteint le niveau observé par le groupe de Schaffhausen, soit celui de LT (Gjorup *et al.*, 1994). Cela nous laisse croire que la lignée NIH

3T3 ne possède pas une sous population de cellules qui peut faciliter l'activité de CT. Dans certains des sous clones tels que: M1, M3 et M6, le niveau de complémentation de CT par NT dépasse jusqu'à deux fois l'activité répliquative de LT (tableau 1). De plus, la plupart des autres sous-clones analysés présente une augmentation significative de l'activité de CT en cotransfection avec NT, ce que l'on n'observe pas dans les cellules de rats. Cette différence entre les cellules de rats et les cellules de souris nous laisse croire que les premières présentent une déficience cellulaire à l'activation de CT. Le domaine amino-terminal (NT) est inactif (figure 10C), comme observé dans les cellules NIH 3T3 M6. Bien que l'expérience fut répétée à plusieurs reprises dans la lignée NIH 3T3 SC1, l'activité de CT n'a jamais été plus élevée que 3%.

2.3. Réplication dans des cellules embryonnaires de souris.

Pour déterminer si l'activité réduite de CT est attribuable à l'établissement cellulaire présent chez les lignées FR3T3 et NIH 3T3, nous avons procédé à un essai sur des cellules embryonnaires de souris. Des embryons de souris gestantes de 13-14 jours ont été prélevés, découpés, et les cellules mises en culture pour un essai de réplication *in vivo*. Dix fois plus de cellules que pour les lignées établies sont utilisées car une grande majorité des cellules meurent et n'adhèrent pas au plastique. À la figure 10B, nous pouvons voir que dans ces cellules primaires, LT possède un niveau d'activité élevé mais CT n'est pas actif et ne peut être complémenté efficacement par NT (tableau 1).

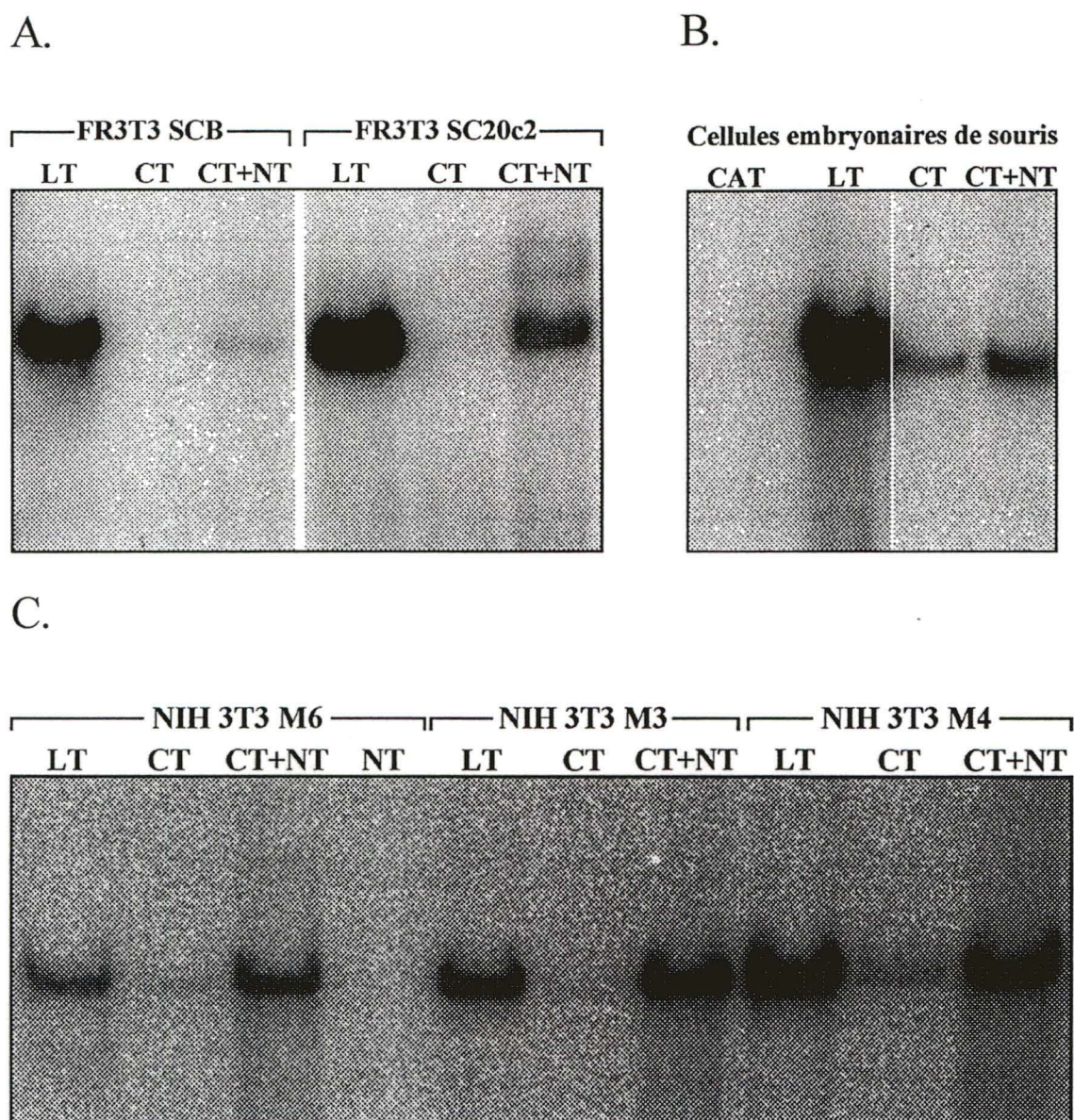


Figure 10. Activité répliquative des domaines CT et NT dans différents types cellulaires. Environ 7×10^5 cellules FR3T3, NIH3T3 et 10×10^6 cellules embryonnaires de souris par Pétri de 10 cm sont cotransfectées (polybrène-DMSO) avec 1 μ g d'ADN à répliquer (pPLCAT) et 5 μ g du (des) vecteur(s) T. Quarante-huit heures après la transfection, l'ADN est extrait par la méthode de Hirt, digéré par *Bcl*I et *Dpn*I, puis hybridé avec 536 pb de la séquence codante du gène CAT (fragment *Xba*I-*Nco*I) de pCAT-Basic vector (Promega). Seul l'ADN répliqué apparaît sur les autoradiogrammes de la figure. Autoradiogrammes d'essais effectués sur des cellules: A. FR3T3, B. embryonnaires de souris, C. NIH3T3. CAT, pPLCAT; LT, pCMV-LT; CT, pCMV-CT; NT, pCMV-NT.

Tableau 1. Activité répllicative des domaines CT et NT dans différents types cellulaires.

	<i>Sous-clone</i>	<i>LT</i>	<i>CT</i>	<i>CT + NT</i>
NIH 3T3	SC 1	100	2	67
	M1	100	20	235
	M2	100	9	21
	M3	100	3	159
	M4	100	8	59
	M6	100	21	128
	M9	100	13	n.d.
	M10	100	4	26
	M12	n.d.	n.d.	n.d.
FR3T3	SC20c2	100	3	13
	SCB	100	3	6
C.E.S.				
		100	6	13

L'activité répllicative est dosée sur PhosphorIMAGER (Molecular Dynamics) et est exprimée en pourcentage de l'activité de LT dans chaque sous-clone ou type cellulaire. C.E.S., cellules embryonnaires de souris; LT, grand T; NT, domaine amino-terminal de grand T; CT, domaine carboxy-terminal de grand T; n.d. non-déterminé. Conditions identiques à la figure 10.

II. Complémentation de CT par les antigènes T moyen et petit T.

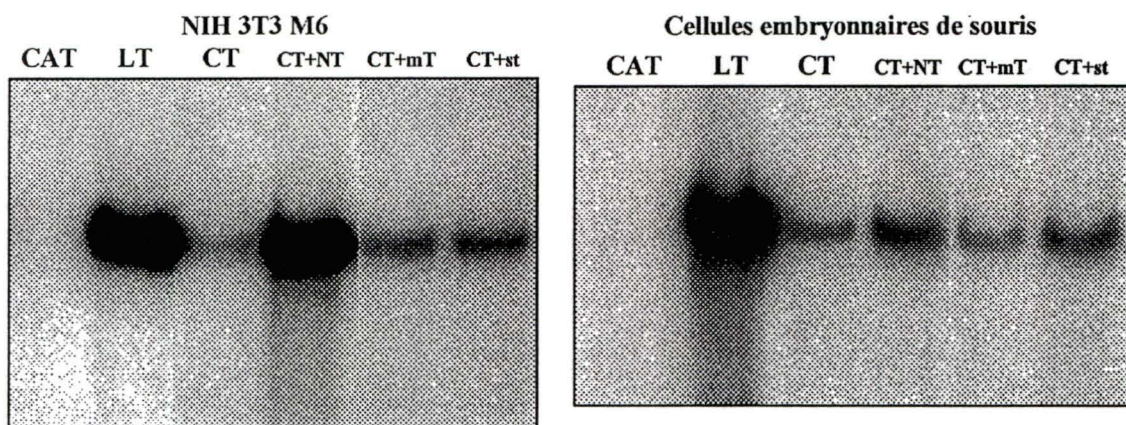
Nous venons de voir que LT possède la capacité de répliquer le génome viral dans les cellules de rats et de souris, ce qui ne semble pas être le cas pour CT. La capacité de CT serait plus dépendante de la lignée. De plus, NT stimule beaucoup l'activité de CT dans les lignées cellulaires de souris contrairement à ce que l'on peut observer dans les lignées cellulaires de rat. Cela suggère que NT a plus de facilité à stimuler CT dans les cellules de souris, probablement dû au fait que ce sont des cellules permissives. Ainsi, dans les cellules de rats, qui sont semi-permissives, NT serait dans l'incapacité d'agir sur CT. Toutefois, cela serait provoqué par la séparation des deux domaines de grand T car un grand T de type sauvage peut répliquer au même titre dans les cellules de souris et dans les cellules de rats. En plus d'un effet *trans* entre CT et NT, il existerait donc un effet *cis* entre le domaine amino-terminal et le domaine carboxy-terminal dans le grand T de type sauvage. L'établissement cellulaire serait pré-requis à la stimulation de CT par le domaine amino-terminal. Le domaine amino-terminal de grand T est impliqué dans l'immortalisation cellulaire (Holman *et al.*, 1994). La stimulation de la phase S par NT dans des lignées cellulaires établies serait attribuée un rôle redondant au domaine amino-terminal. Tel qu'observé dans un sous-clone possédant un phénotype transformé (SC1) et croissant dans un milieu de culture riche. Outre la stimulation de la phase S, nous suggérons que le domaine amino-terminal de grand T possède une ou des activité(s) permettant la stimulation de la réplication par CT du vecteur rapporteur dans les sous clones de la lignée NIH 3T3. Principalement une activité en *trans* et une activité en *cis*.

Nous avons voulu déterminer si la capacité répliquative de CT provient d'un contrôle ou d'une influence de NT sur la croissance cellulaire. Des essais de répllication en exprimant les antigènes T moyen et petit T ont été effectués dans les sous-clones M6 et SC1 de NIH 3T3 et dans les cellules embryonnaires de souris. D'après la littérature, petit T exerce un effet stimulant sur la répllication du génome viral (Türler et Salomon, 1985; Templeton *et al.*, 1986; Berger et Wintersberger, 1986; Ogris *et al.*, 1992). T moyen, lui, possède le pouvoir transformant du virus du polyome (Carmichael *et al.*, 1982). Comme les trois antigènes présentent 79 acides aminés identiques, nous avons voulu voir si les deux autres oncogènes viraux permettent une complémentation de CT dans des cellules établies et dans des cellules primaires tel qu'il a été observé chez NIH 3T3 avec d'autres oncogènes viraux (Gjorup *et al.*, 1994). Dans aucun cas, le niveau de répllication observé lorsque CT est exprimé avec NT n'est obtenu avec petit T (st) et T moyen (mT); (figure 11). Petit T stimule toutefois un peu l'activité de CT. Dans les cellules embryonnaires de souris, l'effet ne peut être évalué (figure 11B) car NT a un pouvoir stimulant très faible.

Ces résultats viennent confirmer que NT n'agit pas seulement en stimulant la croissance cellulaire. Il possède une activité qui lui est propre et qui n'est pas présente chez les autres antigènes T viraux, et ce même si les trois antigènes présentent une région identique. Il semble donc y avoir complémentation de fonctions spécifiques entre NT et CT dans la cellule. La nature de cette association n'est pas connue mais serait dépendante du type cellulaire. Toutefois aucune liaison entre NT et CT par immunoprécipitation et par gradient de sucrose n'a pu être observée (Holman *et al.*, 1994). Le rôle de NT pourrait être de modifier la fonction d'une protéine cellulaire, ou de CT. Lorsque NT est coexprimé avec CT, il y a décroissance de la mobilité sur SDS-PAGE de la part de CT. Cette décroissance peut

A.

B.



C.

	LT	CT	CT+NT	CT+mT	CT+st
NIH 3T3 SC1	100	2	166	1	28
NIH 3T3 M6	100	10	100	15	18
C.E.S.	100	6	13	4	12

Figure 11. Complémentation de CT par les antigènes T moyen et petit T. Autoradiogrammes d'essais effectués sur des cellules: A. NIH 3T3 M6. B. embryonnaires de souris. C. Activité observée pour les antigènes T, dosée sur phosphorIMAGER (Molecular Dynamics). CAT, pPLCAT; LT, grand T (pCMV-LT); CT, domaine corboxy-terminal de grand T (pCMV-CT); NT, domaine amino-terminal de grand T, (pCMV-NT); mT, T moyen; st, petit T; C.E.S., cellules embryonnaires de souris. Conditions identiques à la figure 10.

être attribuable à la phosphorylation du domaine carboxy-terminal (Gjorup *et al.*, 1994). Il est possible aussi que l' amino-terminus de grand T induise des gènes essentiels à l'activité répllicative de CT.

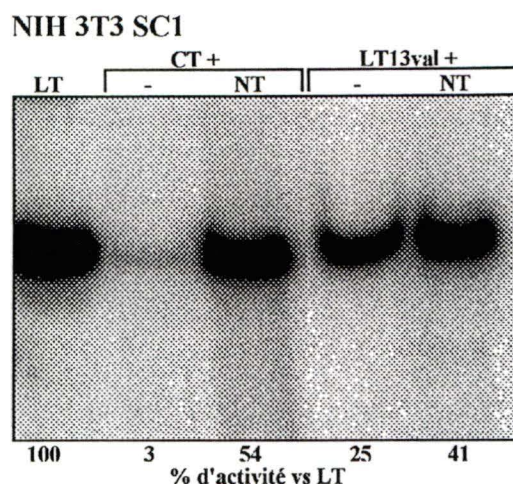
III. Mutation 13val et réplication virale.

Un mutant de grand T qui possède une mutation dans le domaine amino-terminal de l'antigène T est disponible (figure 8); (Larose *et al.*, 1991). C'est le mutant LT13val. Il possède une mutation ponctuelle à la position 13 où l'acide aminé leucine de grand T de type sauvage est changé en valine. Cette mutation affecte la protéine dans plusieurs rôles dont l'immortalisation et la réplication du génome viral. Ce mutant présente une très faible activité répliquative dans les cellules de rats. Nous avons donc voulu savoir si LT13val peut être un mutant fonctionnellement similaire à CT. Pour cela, des essais de réplication *in vivo* ont été effectués dans les sous-clones SC1 et M6 de la lignée NIH 3T3.

1. Implication de la mutation 13val dans la réplication.

Tout d'abord, la figure 12A montre que dans le sous-clone NIH 3T3 SC1, LT13val présente une activité répliquative de 25% comparativement à LT. De plus, l'acido-terminal de grand T peut activer LT13val. Des résultats similaires ont été obtenus dans le sous-clone M6. La substitution d'un seul acide-aminé en amino-terminal diminue la capacité répliquative de LT. L'activité peut être recouverte en partie par l'expression de NT dans la cellule. De plus, LT13val est plus actif que CT. Nous ne pouvons conclure que LT13val et CT sont des altérations fonctionnellement apparentées. Le résidu 13 fait probablement partie d'un domaine impliqué dans l'induction de la réplication.

A.



B.

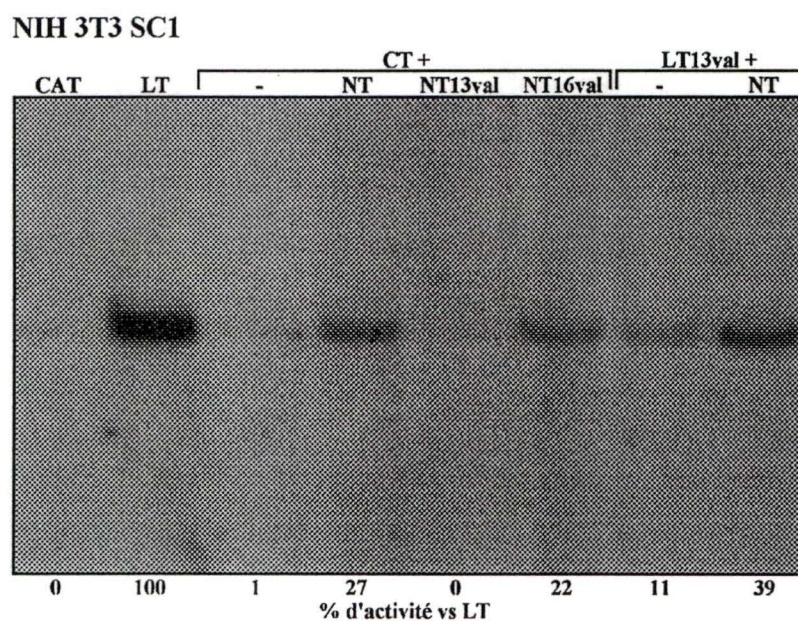
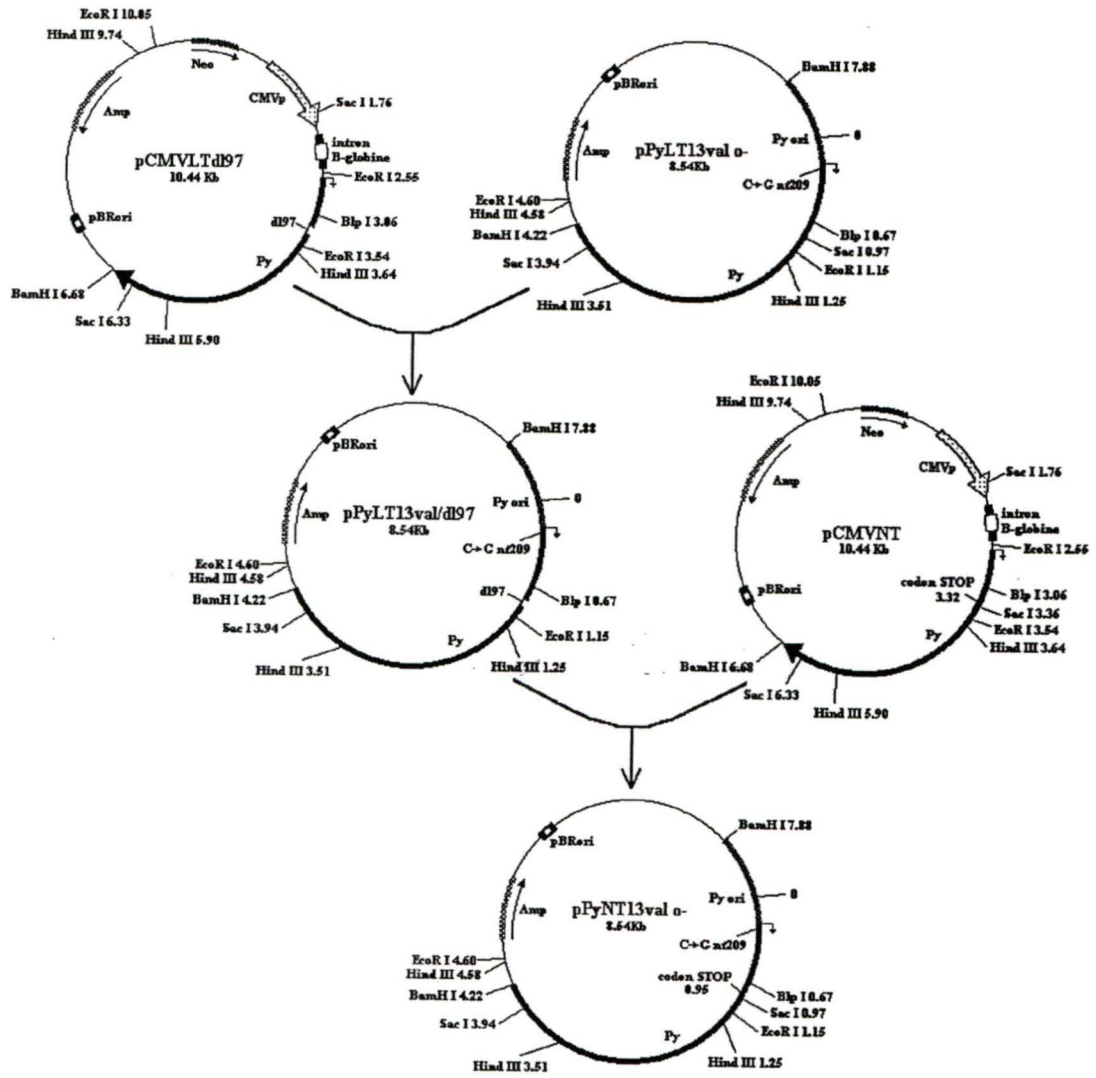


Figure 12. Activité répliquative de la mutation 13val. A. Activité répliquative du mutant LT13val dans les cellules NIH 3T3 SC1. B. Activité de l'amino-terminus portant la mutation 13val. CAT; (pPLCAT), LT, grand T (pCMV-LT); CT, domaine C-terminal de grand T (pCMV-CT); NT, domaine N-terminal de grand T (pCMV-NT); LT13val, mutant 13val de grand T (pPyLT13val); NT13val, NT portant la mutation 13val (pPyNT13val); NT16val, NT portant la mutation 16val (pPyNT16val). Le pourcentage d'activité des mutants, relativement à LT, est indiqué au bas des autoradiogrammes. Conditions identiques à la figure 10.

2. Construction du mutant NT13val et du mutant NT16val.

Nous avons voulu déterminer si la mutation 13val affecte la stimulation par l'aminoterminal. Pour cela, nous avons transféré le codon STOP du vecteur pCMV-NT dans le vecteur pPyLT13valo- (figure 13). L'inverse (transfert de la mutation 13val dans pCMV-NT) est très difficile par des digestions enzymatiques dû à la différence de séquence en 5' de l'ATG. Toutefois, il apparaît que LT sous le promoteur CMV ou le promoteur viral possède la même activité répliquative (non montré). Ainsi, le vecteur pPy peut être utilisé tout autant que le vecteur pCMV. Une première étape est la formation d'un plasmide intermédiaire. Le fragment *BlnI-BamHI* de pCMV-LTdl97 est transféré dans pPyLT13valo-. Cette façon de faire facilite l'analyse des recombinants. La formation du plasmide intermédiaire 13val-dl97 élimine un site *SacI* et l'intégration du fragment *BlnI-BamHI* de pCMV-NT dans l'intermédiaire remet un site *SacI* (figure 13). Nous avons procédé de la même façon pour la mutation 16val, où la leucine en position 16 est changée en valine.

A.



B.

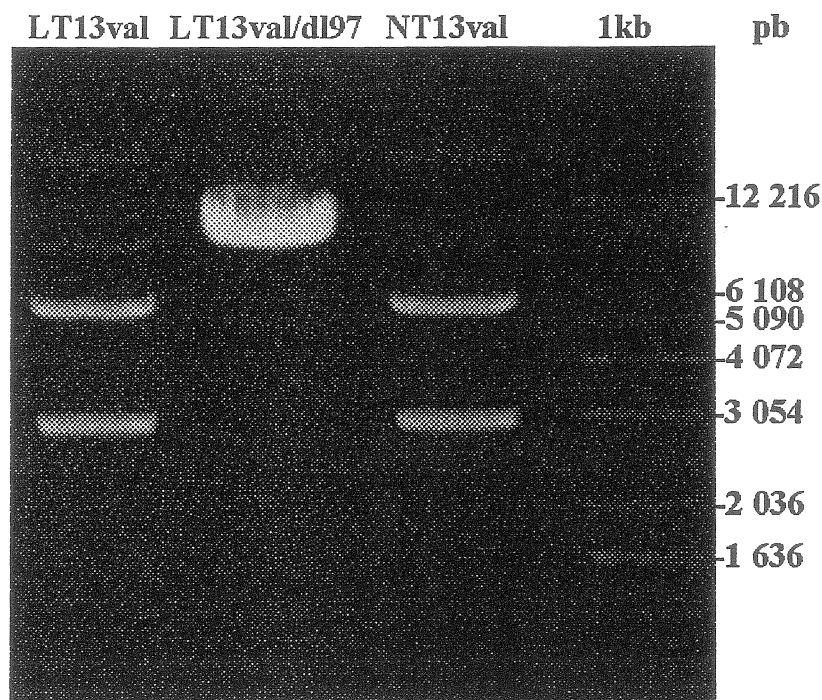


Figure 13. Construction du vecteur pPyNT13val (et pPyNT16val). A. Procédure de clonage pour la construction du vecteur pPyNT13val. Le transfert du fragment *Blp*I_{3.06}-*Bam*HI_{6.68} de pCMV-LTdl97 dans pPyLT13val forme un plasmide intermédiaire 13val-dl97. Par la suite, le transfert du fragment *Blp*I_{3.06}-*Bam*HI_{6.68} de pCMV-NT dans le plasmide intermédiaire forme le vecteur pPyNT13val. Cette procédure a été utilisée pour s'assurer du recombinant par la perte d'un site *Sac*I pour l'intermédiaire et le gain du site *Sac*I pour le vecteur final. B. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% de la digestion par *Sac*I des recombinants obtenus (~1µg d'ADN), coloration au bromure d'éthidium. 1Kb, 1Kb ladder (Gibco BRL); LT13val, pPyLT13val; LT13val/dl97, intermédiaire pPyLT13val/dl97; NT13val, pPyNT13val.

3. Effet du mutant NT13val.

Le mutant NT13val a été utilisé dans des essais de réplication pour déterminer si l'acide aminé en position 13 est responsable de la stimulation de l'activité répliquative de CT par l'acido-terminus. Le mutant NT16val est utilisé comme contrôle puisque la mutation 16val n'affecte pas la capacité répliquative de LT (non montré). La présence d'une mutation à la position 13 élimine la stimulation de CT par l'acido-terminus (figure 12B). Le mutant NT16val présente la même activité que NT. Ce résultat démontre que l'acide aminé 13 est essentiel pour l'induction de la réplication.

Encore une fois, nos résultats suggèrent que NT présente au moins deux fonctions impliquées dans l'activation de la réplication. La réplication serait stimulée par une fonction en *trans* de l'acido-terminus de grand T. En effet, NT peut stimuler CT et implique le résidu 13. Une fonction en *cis* serait également nécessaire puisque LT13val est plus actif que CT et que la mutation 13val dans NT rend l'acido-terminus de grand T inactif dans la stimulation de la réplication virale.

IV. Mutation 13val et cycle cellulaire.

La protéine du rétinoblastome, pRB, joue un rôle critique dans la progression du cycle cellulaire (de G1 à M). Plusieurs facteurs participent à cette progression. La forme active de pRB est la forme hypophosphorylée et c'est sous cette forme que pRB cause l'arrêt du cycle au point R, en G1, avant la phase S. Cet arrêt est nécessaire à la cellule pour "évaluer" son état et "décider" de l'action à entreprendre; poursuivre son cycle vers la mitose, se différencier ou permettre l'apoptose cellulaire (figure 7); (Weinberg, 1995). Le mécanisme par lequel pRB arrête la cellule est via la famille des facteurs de transcription E2F. La liaison de pRB à E2F empêche le facteur de transcription d'agir et d'activer les gènes sous son contrôle. Parmi les gènes qui sont impliqués dans la réplication on peut citer, *c-myc*, *c-myb*, ADN polymérase α , thymidine kinase, dihydrofolate réductase et E2F lui-même (Weinberg, 1995). La liaison pRB/E2F n'empêche pas le facteur de transcription E2F de lier l'ADN. La protéine pRB empêche la formation du complexe transcriptionnel (Sidle *et al.*, 1996). En empêchant la liaison de pRB à E2F, par la phosphorylation de pRB, la cellule peut progresser dans le cycle cellulaire. Les petit virus à ADN inactivent pRB en utilisant une protéine virale qui lie pRB. Cette liaison défait le complexe pRB/E2F et provoque la poursuite du cycle cellulaire. Cela permet au virus de se répliquer car il est dépendant de la cellule pour cette fonction.

La mutation 13val a initialement été créée pour étudier l'interaction de grand T avec la protéine supresseur de tumeur pRB. En effet, il y a, dans toutes les protéines virales qui lient le produit du gène *RB*, deux séquences d'acides aminés très conservées. Les séquences ne sont pas contiguës et sont désignées les régions 1 et 2. Les régions 1 et 2 de la protéine

E1A de l'adénovirus sont chacune suffisante pour complexer pRB (Egan *et al.*, 1988; Whyte *et al.*, 1989). La région 2 du grand T de SV40 est aussi suffisante pour la formation du complexe mais la fonction de la région 1 est encore imprécise. En effet, le groupe de Livingston a démontré que la majeure partie de la séquence de la région 1 n'est pas essentielle pour la liaison à pRB par le grand T de SV40 (DeCaprio *et al.*, 1988).

Notre groupe a démontré que tout en étant essentielle, la liaison à pRB n'est pas suffisante pour conférer à l'antigène grand T son pouvoir immortalisant (Larose *et al.*, 1991). La simple substitution d'un acide aminé dans la région 1 peut abolir la fonction d'immortalisation, tout en ayant la capacité de lier pRB. Cette substitution est la mutation 13val (Larose *et al.*, 1991). Toutefois, nous ne savons pas si l'interaction de LT13val avec la protéine pRB est fonctionnelle.

1. Transactivation d'un promoteur sous le contrôle d'éléments E2F: liaison à pRB.

L'amino-terminus, en plus de posséder un domaine de liaison à pRB (figure 4) ayant ainsi la possibilité d'induire la phase S, semble posséder une autre activité. Il a été observé qu'une mutation dans le domaine de liaison à pRB, affecte la stimulation de NT. Ce mutant stimule plus faiblement CT que ne le fait NT dans des cellules privées de sérum (Gjorup *et al.*, 1994).

La mutation 13val dans le domaine amino-terminal de grand T élimine la stimulation de la réplication du génome viral par CT. Cette mutation n'élimine pas la capacité de LT13val de lier pRB mais le rend non-immortalisant (Larose *et al.*, 1991). Il se pourrait que la liaison

de LT13val à RB ne soit pas fonctionnelle. C'est à dire que LT13val, tout en liant pRB, ne sépare pas le complexe pRB/E2F. De cette façon, le cycle cellulaire ne serait pas, ou peu, affecté par la présence de l'antigène LT13val. Nous avons déterminé si la liaison LT13val/pRB est fonctionnelle. Pour ce faire, le gène bactérien de l'acétyltransférase du chloramphénicol (CAT) sous le contrôle d'éléments E2F est utilisé. La procédure est basée sur le mécanisme d'action de pRB et est représentée à la figure 14A. La présence d'un antigène pouvant lier et déloger pRB du facteur de transcription E2F entraînera la transcription du gène CAT. L'activité CAT reflète alors le niveau d'activité du promoteur, soit la capacité pour un mutant de lier pRB et d'induire la phase S.

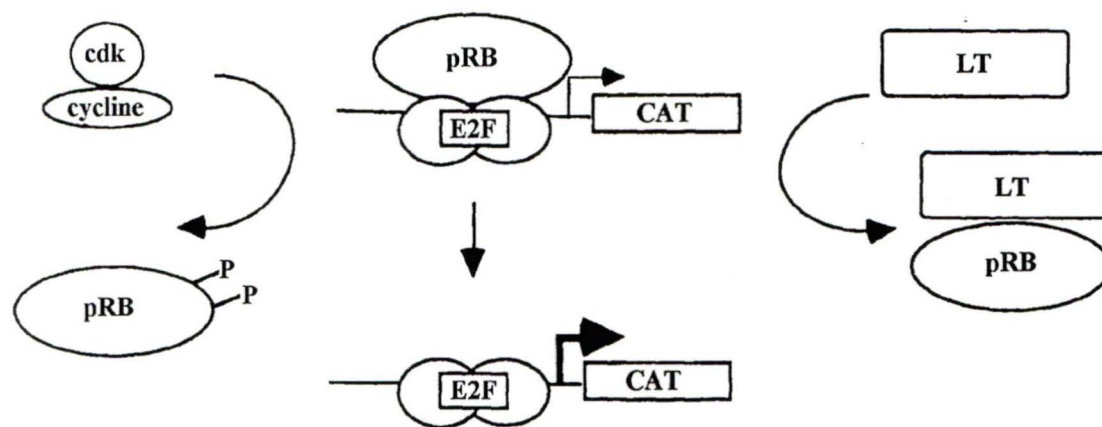
L'enzyme CAT catalyse le transfert de groupements acétates sur le chloramphénicol pour le convertir en dérivés mono et diacétylés. L'activité de l'enzyme est évaluée par le pourcentage de conversion du [^{14}C]-chloramphénicol en ses formes acétylées. Les vecteurs encodant les mutants de l'antigène grand T sont cotransfectés avec le plasmide rapporteur A10-E2F-CAT (Howes *et al.*, 1996) par la méthode à la lipofectAMINETM Reagent dans les cellules NIH 3T3 SC1 et FR3T3 SCB. La méthode au polybrène-DMSO n'est pas utilisée parce qu'elle ne donne pas de signal de conversion du chloramphénicol. Deux jours après la transfection, un extrait cellulaire est produit et normalisé selon son contenu en protéines d'un échantillon à l'autre. Pour respecter la linéarité de la réaction enzymatique aux conditions utilisées, la conversion du chloramphénicol doit être inférieure à 50%.

Le mutant LTdl141 est utilisé comme contrôle négatif de la transactivation du promoteur E2F. La raison étant que LTdl141 présente une délétion de 6 acides aminés entre les positions 141 et 147. Cette délétion enlève le motif présent chez toutes les protéines

virales qui sont reconnues avoir la capacité de lier pRB, le motif D/N-L-X-C-X-E (DeCaprio, *et al.*, 1988; Dyson, *et al.*, 1990; Dyson, *et al.*, 1989; Whyte, *et al.*, 1988). Comme constaté à la figure 14B, ce mutant ne transactive pas le promoteur E2F. L'activité de LT13val est similaire à celle de LT. De même que NT13val possède la même activité que NT. Les contrôles avec LT16val et NT16val possèdent une activité CAT plus élevée que LT et NT. Selon les résultats obtenus, LT13val et NT13val lient la protéine pRB et dissocient le complexe pRB/E2F, tout comme LT et NT. NT induit donc la phase S via pRB. C'est un effet en *trans* de la stimulation de la réplication virale. Puisque NT13val ne stimule pas la réplication par CT, mais induit la phase S, l'amino-terminus de grand T possède une autre fonction *trans*, plus importante, permettant la stimulation de la réplication virale. Cette fonction implique la position 13 de LT. Il est intéressant de noter que LT13val lie pRB de façon fonctionnelle mais que cette liaison ne conduit pas à l'immortalisation cellulaire.

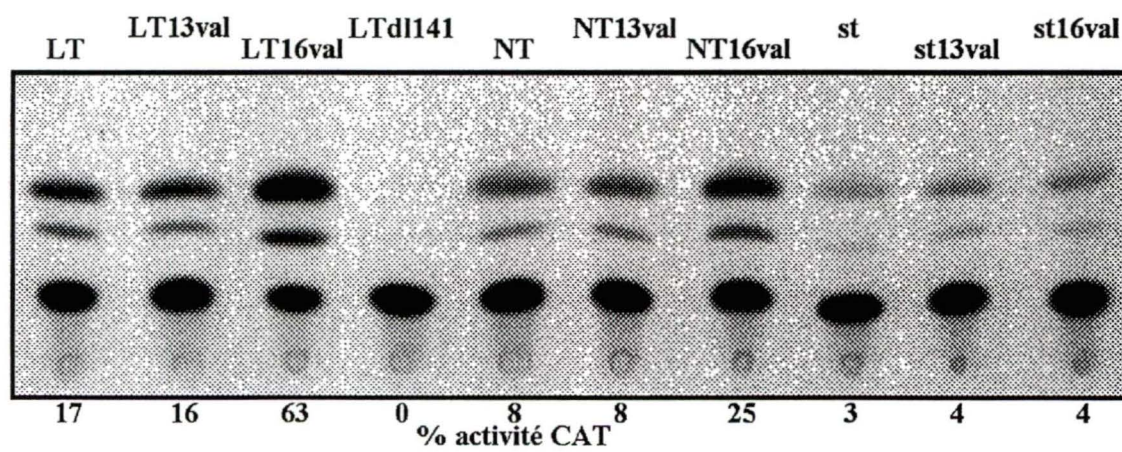
Figure 14. Transactivation d'un promoteur sous le contrôle d'éléments E2F. A. Principe de la procédure utilisée. La présence d'antigènes T pouvant lier pRB dans la cellule conduit à la transactivation du promoteur E2F du plasmide A10-E2F-CAT et à l'expression du gène CAT. B. Essai enzymatique. Des cellules sont cotransfectées par le vecteur E2F-A10-CAT et un vecteur T. Après 48 heures, des extraits cellulaires sont dosés pour leur contenu protéique et leur activité CAT. Le [^{14}C]-chloramphénicol et les produits d'acétylation sont séparés par chromatographie sur couche mince (par ordre de mobilité croissante: [^{14}C]-chloramphénicol, 1-acétate [^{14}C]-chloramphénicol et 3-acétate [^{14}C]-chloramphénicol). L'activité CAT est dosée sur phosphorIMAGER (Molecular Dynamics) et représente le taux de conversion du chloramphénicol en ses formes acétylées (au bas de la figure).

A.



B.

NIH 3T3 SC1



2. Effet de petit T sur la transactivation d'un promoteur E2F.

Petit T exerce un effet stimulant sur la réplication du génome viral et contribue à l'induction de la phase S (Ogris *et al.*, 1992). Il permet une croissance cellulaire à une très haute densité (Cherington *et al.*, 1986; Noda *et al.*, 1986) mais il n'induit pas les changements morphologiques associés à la transformation. La protéine cellulaire principale contrôlant le cycle cellulaire est pRB. Si petit T stimule la progression du cycle cellulaire, il serait possible que cette progression soit directement ou indirectement liée à pRB. Petit t (st) ainsi que st13val et st16val stimulent la transcription du gène CAT sous le contrôle d'un promoteur E2F (figure 14B). Puisque c'est pRB qui contrôle l'activité du facteur de transcription E2F, petit T devrait agir d'une quelconque façon pour inhiber pRB. Par contre, petit T ne possède pas le motif de liaison à pRB. Il doit nécessairement agir indirectement sur pRB. Ce mécanisme d'action demeure toutefois inconnu. On propose toutefois une modification post-traductionnelle de pRB provoquée par la présence de petit T dans la cellule.

V. Mutation dl97 et réplication virale.

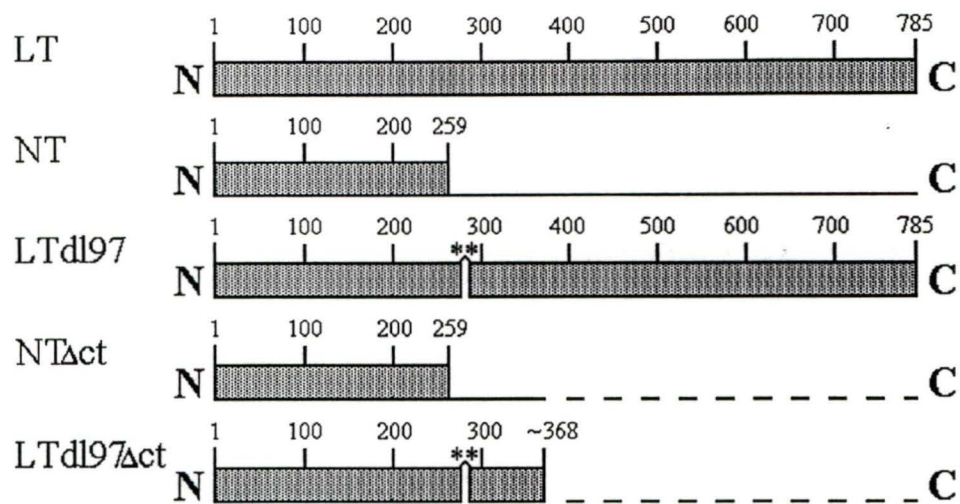
Un mutant de délétion de grand T qui totalement inactif dans la réplication: c'est le mutant LTdl97 produit dans le laboratoire d'accueil lors d'études sur la complémentation de grand T avec l'activité de transformation associée à l'antigène T moyen (Asselin *et al.*, 1986); (figure 8). Ce mutant présente une délétion de 10 acides aminés entre les positions 270 et 280. Il s'est avéré par la suite que le mutation dl97 rend l'antigène grand T inactif dans la réplication du génome viral.

1. Complémentation de CT par LTdl97.

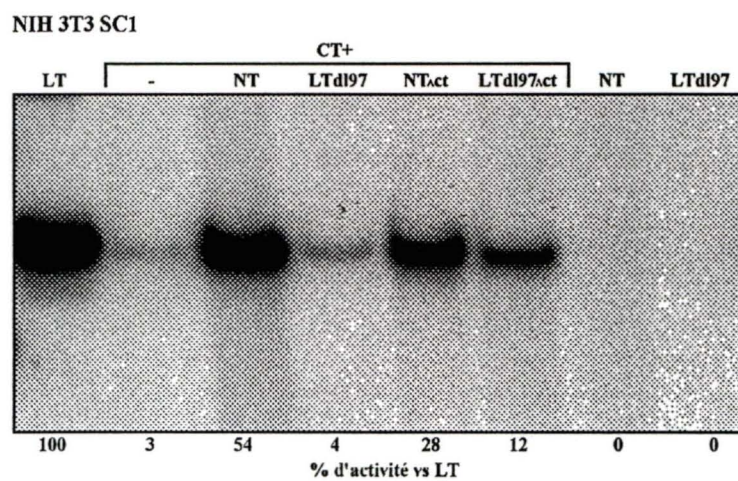
Le mutant LTdl97 possède en totalité le domaine amino-terminal (NT) de grand T (a.a. 1-259). Toutefois, avec ce mutant ne parvient pas à stimuler efficacement CT dans des essais de réplication *in vivo*, comme montré à la figure 15 dans la lignée cellulaire NIH 3T3 SC1 et dans d'autres lignées. Ce résultat est assez surprenant puisque LTdl97 présente toute la séquence de l'amino-terminus de grand T. Il arrive toutefois dans peu de cas qu'il y ait activation.

Figure 15. Activité répliquative du mutant LTdl97 et du mutant LTdl97 tronqué en carboxy-terminal A. Représentation schématique des mutants NT et LTdl97. Les boîtes représentent les régions codantes des protéines. Les traits représentent l'ADN codant mais non traduit (dû à la présence d'un codon STOP pour les mutants NT). Les pointillés représentent l'ADN en 3' du site de coupure *HindIII*. B. Autoradiogramme d'un essai de répliquaison effectué sur des cellules NIH 3T3 SC1. C. Activité observée pour les antigènes T, dosée sur phosphorIMAGER (Molecular Dynamics). n.d., non déterminé; LT, grand T (pCMV-LT); CT, domaine carboxy-terminal de grand T (pCMV-CT); NT, domaine amino-terminal de grand T, (pCMV-NT); LTdl97, mutant LTdl97 (pCMV-LTdl97); NTΔct, vecteur NT avec une délétion du fragment *HindIII-HindIII* (pCMV-NTΔct); LTdl97Δct, mutant LTdl97 tronqué en carboxy-terminal (pCMV-LTdl97Δct); C.E.S., cellules embryonnaires de souris. Conditions identiques à la figure 10.

A.



B.



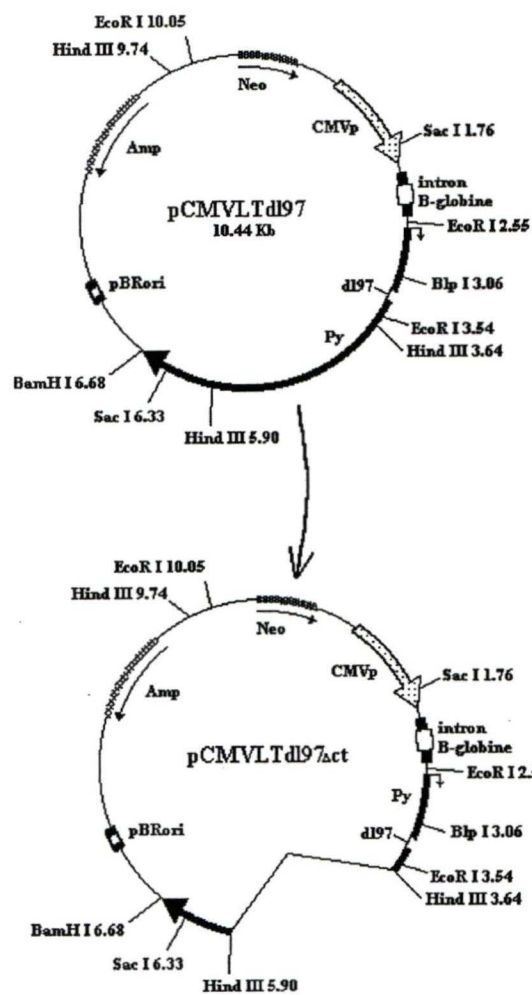
C.

	<i>LT</i>	<i>CT</i>	<i>CT+NT</i>	<i>CT+LTdl97</i>	<i>CT+NTΔct</i>	<i>CT+LTdl97Δct</i>
C.E.S.	100	6	13	1	n.d.	7
NIH 3T3 SC1	100	2	67	4	30	10
NIH 3T3 M6	100	10	100	23	n.d.	n.d.

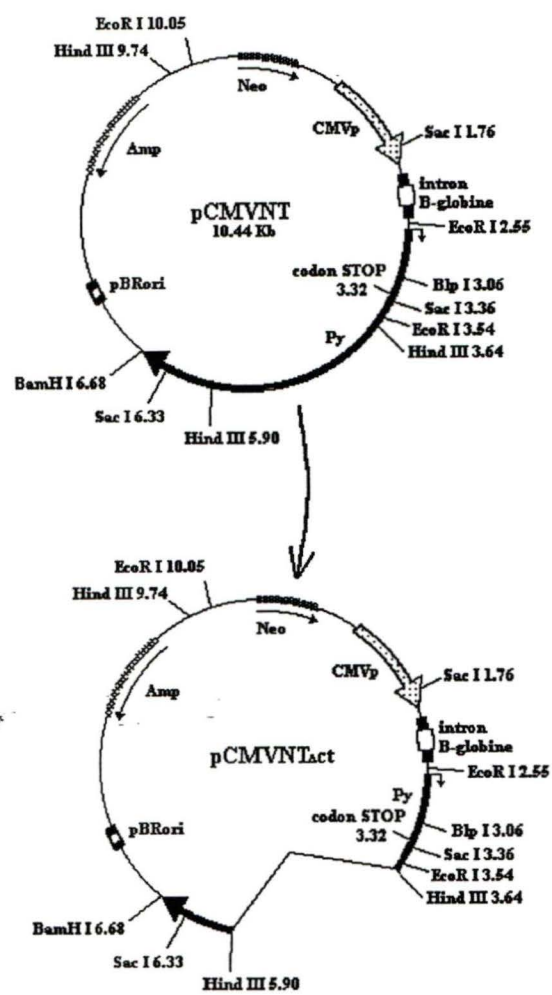
2. Construction d'un mutant LTdl97 tronqué en carboxy-terminal.

Puisque LTdl97 ne parvient pas à compléter CT, une grande partie de la séquence codante en 3' de la délétion dl97 a été enlevé pour obtenir un mutant tronqué en carboxy-terminal. Ce mutant a été obtenu en enlevant un fragment *HindIII* au plasmide encodant LTdl97 (figure 16). Cette coupure dans le génome viral provoque l'expression d'un mutant tronqué, LTdl97 Δ ct. Par contre, le signal de polyadénylation pour les ARN messagers précoces de polyome a été enlevé (Kamen *et al.*, 1980). Il existe toutefois un second signal de polyadénylation dont le rôle est inconnu dans la séquence codante, avant la coupure *HindIII* (Kamen *et al.*, 1980). Pour avoir un patron d'expression similaire entre le mutant tronqué et NT, le même fragment est enlevé au vecteur pCMV-NT.

A.



B.



C.

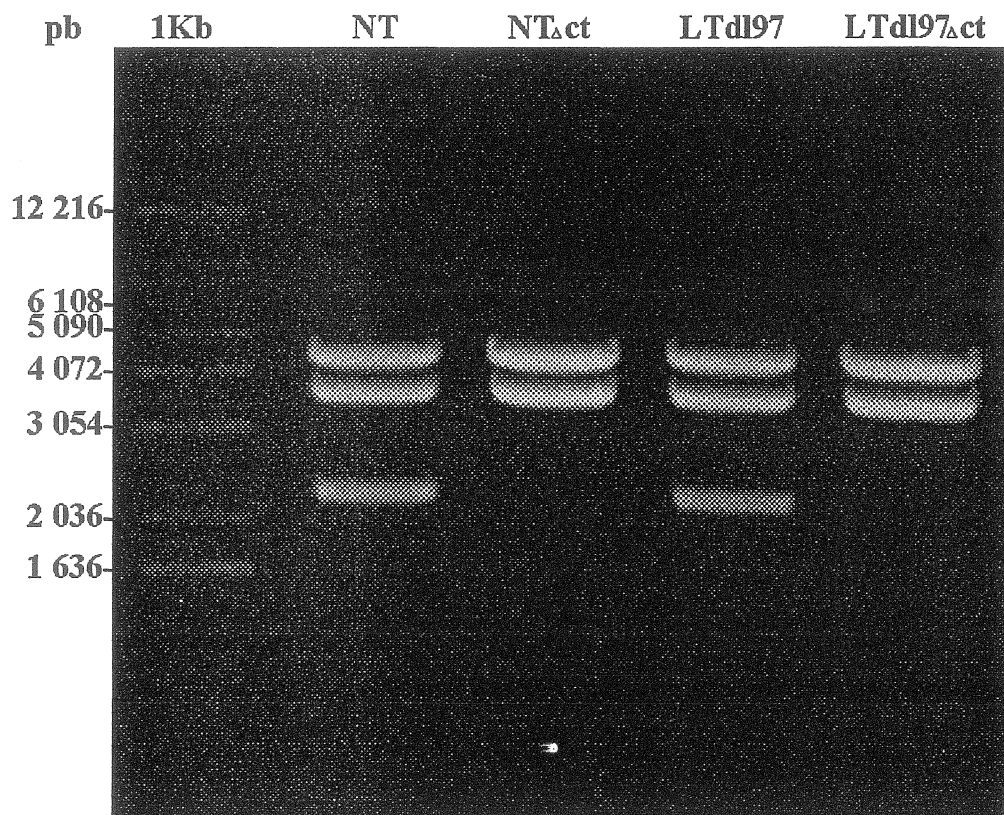


Figure 16. Construction des vecteurs pCMV-LTdl97 Δ ct et pCMV-NT Δ ct. A. et B. Procédure de clonage pour la construction du vecteur pCMV-LTdl97 (A) et pCMV-NT Δ ct (B). L'enlèvement du fragment *Hind*III_{3,64}-*Hind*III_{5,90} de pCMV-LTdl97 et pCMV-NT conduit à la formation du vecteur pCMV-LTdl97 Δ ct et pCMV-NT Δ ct respectivement. C. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% de la digestion par *Hind*III des recombinants obtenus (~1 μ g d'ADN), coloration au bromure d'éthidium. 1Kb, 1Kb ladder (Gibco BRL); NT, pCMV-NT; NT Δ ct, pCMV-NT Δ ct; LTdl97, pCMV-LTdl97; LTdl97 Δ ct, pCMV-LTdl97 Δ ct.

3. Effet du mutant tronqué LTdl97 Δ ct.

Le mutant LTdl97 Δ ct ainsi que NT Δ ct ont été utilisés pour compléter CT dans un essai de réplication. Le mutant LTdl97 tronqué est maintenant apte à stimuler la réplication par CT (figure 15B). L'augmentation du signal obtenu pour LTdl97 Δ ct est significatif puisque le signal obtenu pour NT Δ ct est inférieur à celui de NT. Cela laisse croire qu'une portion en carboxy-terminal de LTdl97 empêche l'activation par sa portion amino-terminal.

Comme décrit à la figure 4, le domaine carboxy-terminal de grand T possède plusieurs fonctions impliquées dans la réplication. Les différences qui existent entre NT et LTdl97 et qui sont probablement responsables de l'inactivation par LTdl97 sont que NT ne peut ni se lier à CT et ni à l'origine de réplication. Ce n'est pas le cas pour LTdl97. Dans un cas, il trapperait CT dans la cellule et en empêcherait la réplication. Dans l'autre, LTdl97 empêcherait CT de venir se fixer à l'origine. Dans les deux cas, il y aurait un dosage entre l'activité stimulatrice du domaine amino-terminal et l'activité inhibitrice du domaine carboxy-terminal de LTdl97.

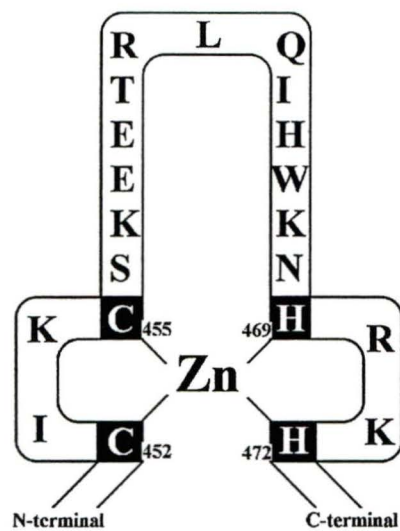
4. Construction du double mutant: LTdl97zn-.

Le domaine doigt de zinc est responsable chez SV40 de l'assemblage de l'hexamère à l'origine (Loeber *et al.*, 1991). Même si les structures en doigt de zinc sont souvent impliquées dans la liaison de protéines à l'ADN, il existe des protéines qui ont de tels éléments mais qui ne lient pas l'ADN (Hubbard *et al.*, 1991; Webster et Ricciardi, 1991). La protéine grand T du virus du polyome semble être dans cette classe. Des mutations à l'intérieur du doigt de zinc de grand T n'empêchent pas la liaison de grand T à l'ADN mais empêchent l'association entre les antigènes grand T et ainsi la formation d'hexamères (Rose et Schaffhausen, 1995).

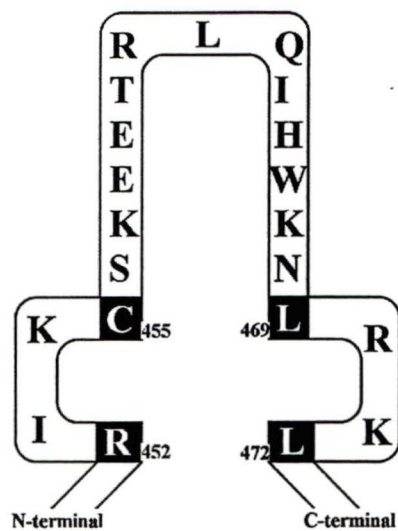
Nous avons entrepris la construction d'une protéine grand T qui porterait la mutation dl97 ainsi qu'une mutation dans le domaine doigt de zinc, la mutation 11-63-72 (Rose et Schaffhausen, 1995). C'est une triple mutation ponctuelle aux nucléotides T1911C, A1963T et A1972T, changeant respectivement les acides aminés 452Cys en Arg, 469His en Leu et 472His en Leu. Cette substitution d'acides aminés inactive la structure en doigt de zinc (figure 17A). Pour plus de commodité, cette triple mutation est désignée zn-. L'échange du fragment *HindIII*-*Bam*HI du plasmide 11-63-72 au vecteur pCMV-LTdl97 forme un vecteur encodant la protéine LTdl97zn- (figure 17B). L'identification du recombinant est possible par digestion enzymatique (figure 17C). La mutation au nucléotide 1911 abolie un site NsiI, ¹⁹¹⁰ATGCAT devient ¹⁹¹⁰ACGCAT. Cette procédure a également été utilisée pour produire un vecteur pCMV-LTzn-.

A.

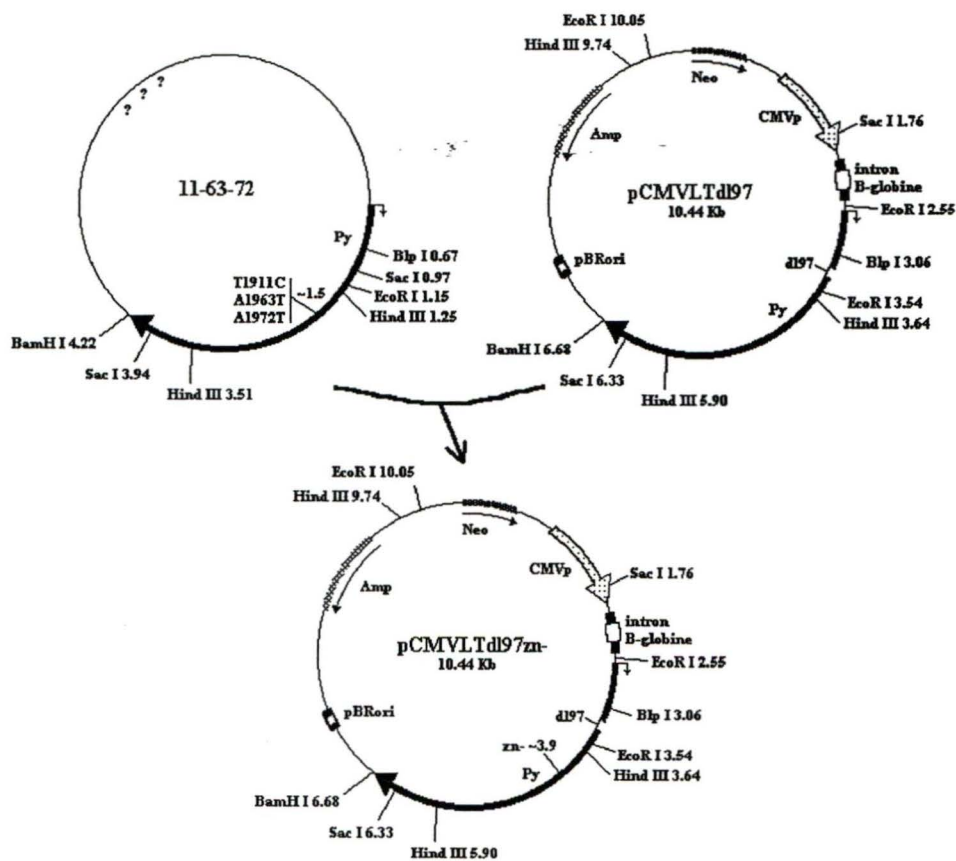
LT



Mutant 11-63-72



B.



C.

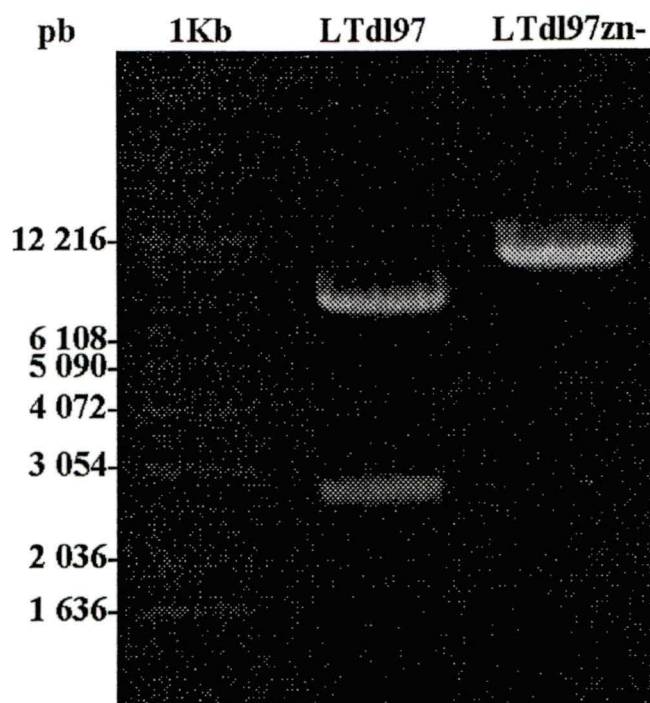


Figure 17. Construction du vecteur pCMV-LTdl97zn-. -A. Représentation du domaine doigt de zinc chez grand T de polyome. Les acides aminés du doigt de zinc, (positions 452-472) sont représentés par la lettre correspondante. Les acides aminés liant le zinc sont possiblement les cystéines aux positions 452 et 455 et les histidines aux positions 469-472. Le mutant 11-63-72 présente trois mutations ponctuelles sur ces résidus. B. Procédure de clonage pour la construction du vecteur pCMV-LTdl97zn-. Le transfert du fragment *Hind*III_{1.25}-*Bam*HI_{4.22} du vecteur 11-63-72 dans le vecteur pCMV-LTdl97 forme le vecteur pCMV-LTdl97zn-. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% de la digestion par *Bam*HI et *Nsi*I du recombinant obtenu (~1µg d'ADN), coloration au bromure d'éthidium. 1Kb, 1Kb ladder (Gibco BRL); LTdl97, pCMV-LTdl97; LTdl97zn-, pCMV-LTdl97zn-.

5. Effet du mutant LTdl97zn-.

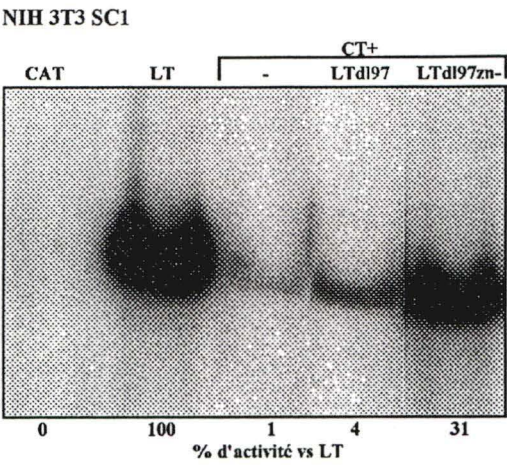
Tout comme le mutant LTdl97Δct, le mutant LTdl97zn- a été utilisé pour voir s'il pouvait compléter CT dans un essai de réplication. Dans cet essai le double mutant LTdl97zn- stimule CT, contrairement à LTdl97 (figure 18A). Ainsi, la présence de la structure en doigt de zinc interfère avec la stimulation de la portion amino-terminale pour le mutant LTdl97.

6. Caractère dominant négatif de la mutation dl97.

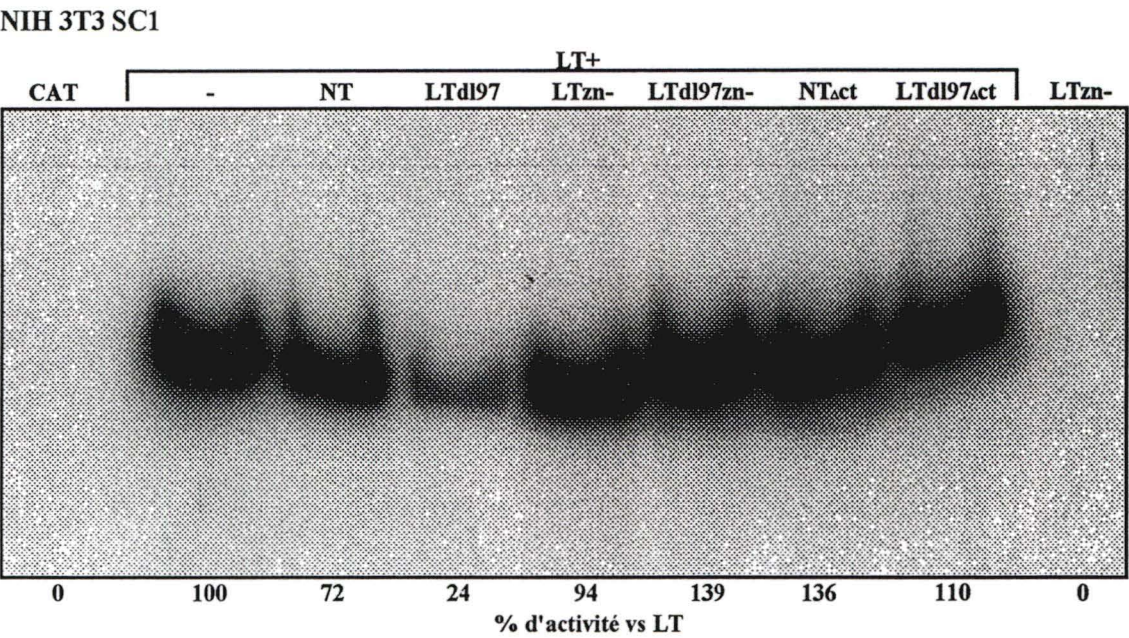
La présence de la mutation dl97 lorsque liée à la structure en doigt de zinc dans grand T semble avoir une forte inhibition dans la capacité répliquative de CT. Pour étudier l'importance de la mutation dl97 dans la réplication, nous avons de nouveau utilisé la technique de réplication *in vivo* pour vérifier si le mutant LTdl97 serait dominant négatif. Deux vecteurs sont transfectés dans la cellule, l'un encodant grand T de type sauvage et l'autre encodant le mutant LTdl97. De cette façon l'événement d'expression de deux allèles dans la cellule est reproduit. De plus, puisque grand T possède l'activité "maximale" de réplication du génome viral, l'activité stimulatrice de l' amino-terminus de LTdl97 est négligeable. La figure 18B montre que la réplication du plasmide rapporteur dans les cellules NIH 3T3 SC1 a été 4 fois moindre lorsque LT est en présence de LTdl97. Par contre, les mutants LTdl97Δct et LTdl97zn- n'induisent plus d'inhibition. Cet essai a été reproduit dans la lignée cellulaire de souris NIH 3T3 M6, dans la lignée cellulaire de rats FR3T3 SC20c2 et dans les cellules primaires de souris (figure 18C).

Figure 18. Activité répliquative du double mutant LTdl97zn-. Autoradiogrammes de différents essais de répliquation A. Cellules NIH 3T3 SC1, complémentation de CT par le mutant LTdl97zn-. B. Cellules NIH 3T3 SC1, caractère dominant négatif de dl97. C. Activité observée pour les antigènes T, dosée sur phosphorIMAGER (Molecular Dynamics). CAT, pPLCAT LT, grand T (pCMV-LT); CT, domaine corboxy-terminal de grand T (pCMV-CT); NT, domaine amino-terminal de grand T, (pCMV-NT); LTdl97, mutant LTdl97 (pCMV-LTdl97); NTΔct, vecteur NT avec une délétion du fragment *HindIII-HindIII* (pCMV-NTΔct); LTdl97Δct, mutant LTdl97 tronqué en carboxy-terminal (pCMV-LTdl97Δct); LTdl97zn-, mutant LTdl97 portant la mutation zn- (pCMV-LTdl97zn-); LTzn-, grand T portant la mutation zn- (pCMV-LTzn-); C.E.S., cellules embryonnaires de souris; n.d non-déterminé. Conditions identiques à la figure 10.

A.



B.



C.

	<i>LT</i>	<i>LT+</i> <i>NT</i>	<i>LT+</i> <i>LTdl97</i>	<i>LT+</i> <i>LTzn-</i>	<i>LT+</i> <i>LTdl97zn-</i>	<i>LT+</i> <i>NTΔct</i>	<i>LT+</i> <i>LTdl97Δct</i>
C.E.S.	100	64	37	n.d.	n.d.	n.d.	64
NIH 3T3 SC1	100	153	29	94	139	137	101
NIH 3T3 M6	100	119	18	n.d.	n.d.	n.d.	223
FR3T3 SC20c2	100	71	24	n.d.	108	n.d.	n.d.

Les expériences menées avec la mutation dl97 confirment que la portion amino-terminale de grand T est activatrice et que LTdl97 est dominant négatif. Le caractère dominant négatif de LTdl97 est dû à la délétion de 10 acides aminés aux position 270 à 280 mais également à la présence de la structure en doigt de zinc. Le doigt de zinc est impliqué dans l'oligomérisation de grand T et la mutation zn- n'empêche pas la liaison à l'ADN (Rose et Shaffhausen, 1995). En présence de grand T, soit que LTdl97 empêche la formation de l'hexamère, ou qu'il conduit à la formation d'hexamères hétérogènes inactifs. Des hexamères formés en partie de protéines LT et de protéines LTdl97.

VI. Phosphorylation des antigènes grand T.

La phosphorylation de l'antigène grand T est très importante pour son activité répliquative et varie au cours du cycle cellulaire (Bockus et Shaffhausen, 1987a; 1987b). Le mutant LTdl97, inactif dans la réplication et qui présente un caractère dominant négatif possède une délétion dans un domaine de phosphorylation de grand T. Ce domaine de phosphorylation est impliqué et est un élément essentiel à la réplication du génome viral (Bockus et Shaffhausen, 1987b). L'absence de ce domaine, c'est-à-dire l'absence d'événements de phosphorylation et/ou déphosphorylation à ce site, serait le facteur menant au contrôle négatif de LTdl97 sur la réplication. En effet, les résidus phosphorylés S271, S274 et T278 sont éliminés dans la délétion dl97.

1. Grand T de SV40.

Le niveau de phosphorylation de l'antigène grand T de SV40 ainsi que les résidus impliqués dans la réplication sont identifiés à la figure 19. Principalement, la thréonine 124 doit être phosphorylée, en combinaison avec la déphosphorylation des sérines 120 et 123 (Cegielska *et al.*, 1994). Il a été observé qu'un mutant de SV40 où la Thr 124 a été modifiée en alanine est capable de former des hexamères *in vitro* mais ne peut débiter la réplication efficacement (Moarefi *et al.*, 1993). Chez le virus du polyome, ce serait le résidu Thr 278 qui aurait cette caractéristique.

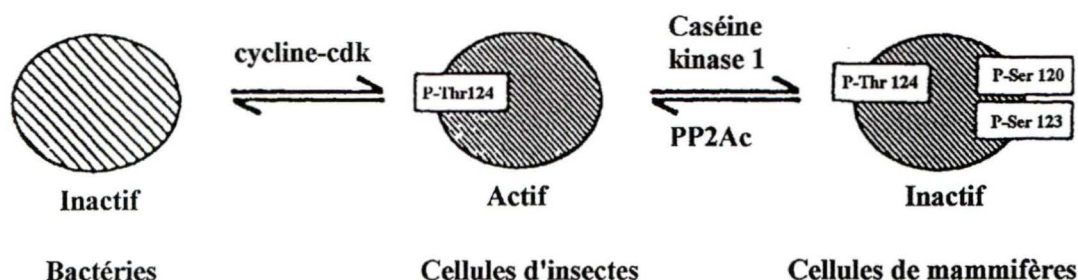


Figure 19. Contrôle *in vitro* de l'activité répliquative de l'antigène grand T de SV40 par la phosphorylation. (Cegielska *et al.*, 1994) Les antigènes grand T produits dans les cellules bactériennes sont sous phosphorylés et nécessitent la phosphorylation *in vitro* de T124 pour être actifs. Les antigènes grand T hypophosphorylés qui sont exprimés dans les cellules d'insectes en utilisant un vecteur de bavulovirus sont actifs. Les antigènes grand T hyperphosphorylés produits dans les cellules de mammifères sont inactifs. Les protéines kinases et phosphatases qui agissent *in vitro* sur les résidus critiques sont indiquées sur la figure.

2. Grand T de polyome.

Tout comme le grand T de SV40, l'activité de grand T de polyome est influencée par son niveau de phosphorylation. Grand T de polyome contient deux sites de phosphorylation. La phosphorylation d'un de ces sites, entre les résidus 257 et 285, semble reliée à la réplication de l'ADN viral (Bockus et Schaffhausen 1987b). Le domaine carboxy-terminal de grand T possède les résidus 264 à 785, il peut donc être sujet aux événements de phosphorylation et/ou déphosphorylation aux résidus S267, S271, S274 et T278. Lorsque NT est coexprimé avec CT, il y a décroissance de la mobilité sur gel SDS-PAGE de la part de CT (Gjorup *et al.*, 1994). Cette décroissance peut être attribuable à la phosphorylation du domaine carboxy-terminal.

3. Induction de gènes par NT.

Dans la plupart des cellules étudiées, surtout dans les sous-clones NIH 3T3, la présence de l'amino-terminus dans la cellule rend CT apte à la réplication. Le mécanisme par lequel NT rend CT compétant n'est pas connu. Il semble toutefois agir sur le niveau de phosphorylation de CT. L'action de NT sur CT peut être indirecte. Il a été observé que NT ne s'associait pas physiquement avec CT (Holman *et al.*, 1994). NT peut modifier la fonction d'une kinase ou d'une phosphatase cellulaire, ou en induire l'expression. Nous avons tenté de vérifier l'hypothèse que NT induit l'expression d'une kinase qui viendrait agir sur les résidus sérines ou le résidu thréonine de CT.

Le vecteur pCMV-NT a été transfecté dans les cellules NIH 3T3 SC1 et M6 et l'ARN total extrait 48 heures plus tard par TRIzol® Reagent. Les cellules NIH 3T3 sont utilisées car c'est dans ces cellules que NT parvient à stimuler CT le plus efficacement. Une transcription inverse est effectuée suite à l'extraction à l'aide de l'oligonucléotide 5'-GAG GAC TCG AGC TCA AGC TTT TTT TTT TTT TTT TT-3', permettant de produire les brins complémentaires aux ARN messagers. Par la suite, les ADNc encodants des kinases eucaryotes du type sérine/thréonine sont amplifiés par PCR à l'aide de l'oligonucléotide 5'-GAG GAC TCG AGC TCA AGC-3' et d'un oligonucléotide dégénéré construit sur la base d'une homologie de séquence (Hanks et Lawton, 1993). C'est la séquence qui code pour le consensus Y/H-R-D-L/I-K-P du sous-domaine VIB de la région catalytique des kinases du type sérine/thréonine, soit: 5'-YAY MGN GAY HTN AAR CC-3'. L'analyse d'une vingtaine d'ADNc obtenus, d'une longueur variant entre 200 et 1700pb, n'a pas été concluante. Après avoir cloné dans le vecteur pBluescript SK+ et procédé au séquençage par la méthode de Sanger, les séquences ont été soumises à GenBank. 17 ADNc possédaient une forte homologie ou étaient identiques à des séquences codantes connues mais qui ne codent pas pour des kinases et 9 ADNc n'ont pas été identifiés.

Il s'est avéré que l'hybridation entre l'amorce dégénéré VIB et l'ADN lors du PCR n'était pas spécifique. Pour quelques clones analysés en détail, on observe en comparant la séquence de l'amorce à la séquence lue qu'il y avait une hybridation fidèle en 3' mais un mauvais appariement en 5' de l'amorce. Ce qui a conduit à la production d'ADNc différents de ceux souhaités. Pour remédier à ce problème, il faudrait augmenter la température d'hybridation pour ainsi augmenter la spécificité de la réaction.

DISCUSSION

Dans le but de mieux comprendre le rôle de l'antigène grand T dans la réplication virale des papovavirus et dans le contrôle du cycle cellulaire, nous avons déterminé l'impact que possède nos divers mutants de grand T qui sont affectés dans leur aptitude à répliquer le génome viral. Pour cela, nous avons effectué principalement des essais de réplication *in vivo*. Ces essais ont l'avantage de nous permettre de déceler rapidement les mutations provoquant une baisse de l'activité répliquative de grand T. De plus, à l'aide de ce type d'essai, nous pouvons observer la complémentation entre deux mutants de grand T. L'étude de mutants de grand T affectés dans la réplication virale, ainsi que l'introduction de nouvelles mutations permettra l'analyse approfondie des mécanismes impliqués dans cette fonction.

Activité du domaine CT de grand T de polyome et stimulation par NT.

La séparation d'un domaine fonctionnel répliquatif distinct de grand T favorise l'étude des mécanismes cellulaires et viraux impliqués dans la stimulation de la réplication virale. A l'aide d'un tel domaine, on peut distinguer plus aisément les fonctions stimulantes de grand T. Le groupe de Schaffhausen a démontré que les résidus 264 à 785 de grand T forment un domaine ayant la capacité de répliquer une molécule d'ADN contenant l'origine de réplication virale. C'est le domaine CT. L'activité de ce domaine semble être influencée par le cycle cellulaire et par la présence du domaine amino-terminal de grand T (résidus 1-259) (Gjorup *et al.*, 1994). En effet, dans un milieu riche en sérum, il a remarqué que CT possédait une activité répliquative similaire à celle de grand T dans les cellules de souris NIH 3T3. Par contre,

dans un milieu privé de sérum, l'activité de CT diminuait beaucoup. Cette diminution pouvait être évitée en cotransfectant l'amino-terminus de grand T. D'où l'idée que NT stimule la phase S et induit ainsi la réplication du génome viral.

Avant le début de ces travaux, notre laboratoire a observé que l'activité du domaine carboxy-terminal (CT) de grand T lors d'essais de réplication ne correspondait pas à ce qui avait été rapporté par le groupe de Schaffhausen (Gjorup *et al.*, 1994). Le domaine carboxy-terminal semblait inactif dans les cellules NIH 3T3. Toutefois, la présence simultanée du domaine amino-terminal de grand T dans la cellule influençait grandement l'activité de CT, et ce en présence d'un milieu riche en sérum. Nous avons observé que CT était inactif dans un milieu riche en sérum dans une lignée cellulaire établie (NIH 3T3 SC1). De plus cette lignée provient d'un transformant spontané de la lignée NIH 3T3. Nous avons alors voulu déterminer quel facteur entraîne la diminution de la réplication par CT dans ces cellules.

L'une de nos premières hypothèses était que l'activité de CT était dépendante du type cellulaire et que l'activité observée chez les cellules NIH 3T3 est attribuable à une minorité de cellules. L'analyse de l'activité de CT dans différents types cellulaires a été entreprise pour tenter de déterminer le type de restriction qui conduit à cette diminution de l'activité. Des cellules de fibroblastes de rats FR3T3, des cellules de fibroblastes de souris NIH 3T3 et des cellules embryonnaires de souris furent utilisés, et ce dans des conditions de culture riche en sérum.

Dans les cellules FR3T3, CT ne possède aucune activité répllicative, contrairement à grand T. De plus, le domaine carboxy-terminal ne peut être

complémenté par la présence de l' amino-terminus de grand T. Ce qui est à l'opposé de ce qui survient dans les cellules de souris. Pour déterminer si l'activité répliquative de CT est attribuable à une minorité de cellules NIH 3T3, il a fallu procéder au sous-clonage de la lignée pour obtenir une population homogène. La lignée NIH 3T3 est composée d'une population hétérogène de cellules. Si à l'intérieur de cette population de cellules, il y a quelques cellules qui peuvent permettre à CT le même taux de réplication que LT, ce taux ne serait pas ou peu observable. En effet, il serait trop faible par rapport aux cellules qui ne permettent pas à CT le même taux de réplication que LT. Le sous-clonage de la lignée NIH 3T3 a permis de démontrer que la faible activité de CT est attribuable à toute la population cellulaire car chacun des sous-clones présentait une faible activité de CT. Dans ces cellules, NT stimule efficacement CT. Le taux de réplication lorsque NT est coexprimé avec CT est semblable à celui de LT seul.

En plus de la permissivité des cellules, l'établissement cellulaire joue un rôle sur la complémentation de CT par le domaine amino-terminal. En effet, dans les cellules embryonnaires de souris, NT ne parvient pas à stimuler l'activité de CT. Contrairement à ce qui est observé dans les sous-clones de la lignée NIH 3T3. Cette étude sur différents types cellulaires a permis de démontrer que le domaine amino-terminal possède plusieurs fonctions permettant la stimulation de CT. En plus d'influencer le cycle cellulaire, NT doit être lié physiquement à CT (dans le contexte de grand T) pour agir dans les cellules semi-permissives et dans les cellules embryonnaires de souris. Il y a donc un effet *cis* sur grand T qui rend l'antigène apte à répliquer l'ADN (figure 20).

Il semble toutefois que l'influence sur le cycle cellulaire par NT ne soit qu'un rôle mineur de la stimulation de la réplication par le domaine amino-terminal. En effet, selon les conditions de culture utilisées, il n'y a pas lieu de croire que le rôle principal de NT est de stimuler la phase S. NT parvient à stimuler CT dans des cellules en croissance continues (NIH 3T3 SC1 est un transformant spontané) dans un milieu riche. De plus, l'utilisation des antigènes T moyen et petit T n'a pas permis de démontrer que l'activation de CT est influencée par le cycle cellulaire.

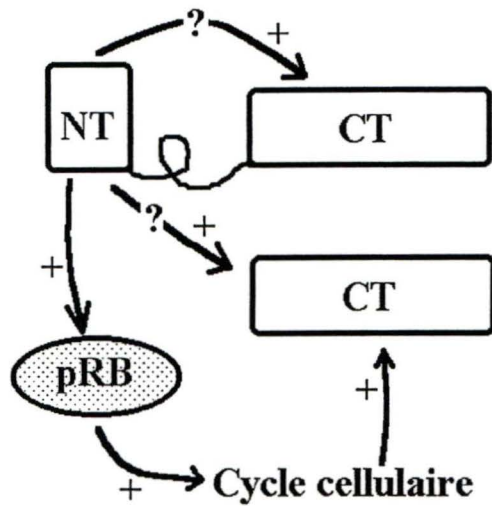
Mutation 13val, réplication et cycle cellulaire.

La mutation 13val, est une mutation dans le premier exon de grand T et affecte la protéine dans sa capacité répliquative et dans l'immortalisation. Ce travail montre que la mutation 13val est une mutation qui affecte une fonction spécifique de l'amino-terminus de grand T. Lorsque la mutation 13val est introduite dans le domaine NT, celui-ci ne peut plus compléter CT. A l'aide d'un essai de transactivation d'un promoteur E2F, il est démontré que LT13val ainsi que NT13val interagit probablement avec la protéine du rétinoblastome pRB de façon fonctionnelle. La protéine pRB est l'acteur principal dans le contrôle du cycle cellulaire, il y a alors tout lieu de penser que NT et NT13val peuvent en induire la progression. Toutefois, cette fonction n'a qu'un rôle mineur dans la stimulation de la réplication par le domaine amino-terminal puisque NT13val est inactif dans la stimulation de CT. De plus, bien que LT13val lie probablement pRB, il est incapable d'immortaliser des cellules primaires. La présence d'un second facteur impliqué dans l'immortalisation est donc suggérée. On ne sait toutefois pas s'il coopère avec pRB ou s'il agit autrement dans l'immortalisation. Notre groupe, lors d'études sur l'immortalisation par l'antigène grand T du

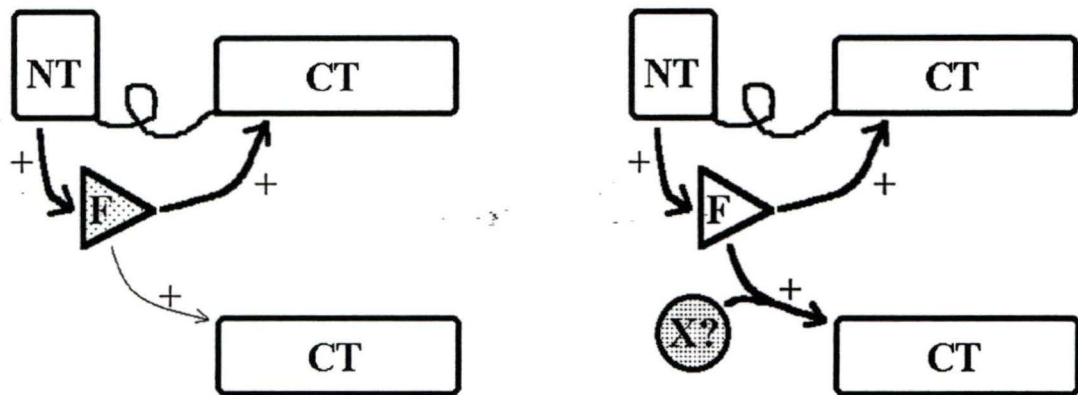
virus du polyome, a proposé l'hypothèse que grand T agissait avec un autre facteur cellulaire que pRB. Nous ne savons toutefois si ce facteur doit lier grand T afin de stabiliser l'interaction avec pRB ou si grand T peut lier indépendamment chacun des deux facteurs (Sullivan, 1991)

La réplication du génome viral par l'antigène grand T nécessite plusieurs fonctions de son domaine amino-terminal. En plus de l'effet en *trans* de la stimulation du cycle cellulaire via pRB, il existe un autre effet *trans* qui implique le résidu 13. Il y a également un effet important en *cis* qui favorise l'activité de grand T dans les cellules (figure 20), surtout dans les cellules autres que NIH 3T3. Dans ces dernières, l'effet *trans* est plus important que l'effet *cis*. Il n'est pas impossible que ces cellules ont acquis ou modifié un facteur permettant de suppléer l'effet *cis* par un effet *trans*. On peut spéculer beaucoup sur le mécanisme impliqué. Imaginons toutefois un facteur F (figure 20) présent dans les cellules de rat et de souris mais qui présente des caractéristiques différentes entre les espèces. Dans les cellules de rats, la spécificité de F est limitée et il n'y a qu'une molécule entière de grand T qui permet au domaine amino-terminal d'agir sur le domaine carboxy-terminal. Dans les cellules de souris, F agit de la même façon que dans les cellules de rats pour grand T. Toutefois, l'établissement cellulaire conduit à une modification directe ou indirecte de F ou d'un autre facteur, ce qui permet alors au domaine NT d'agir sur CT. Il peut y avoir une activation ou une inactivation d'un facteur, soit par la modification de la spécificité du substrat ou soit une modification du niveau d'expression.

A.



B.



FR3T3 et cellules primaires

NIH 3T3

Figure 20. Modèle d'activation du domaine répliatif de grand T. A. Modèle général proposé de la stimulation du domaine carboxy-terminal dans les cellules. Le domaine amino-terminal de grand T agit en *trans* via la protéine pRB et plus directement sur CT. Il y a également un effet *cis* entre l' amino-terminus et le domaine CT. B. Modèles proposés de la stimulation de CT dans les différents types cellulaires.

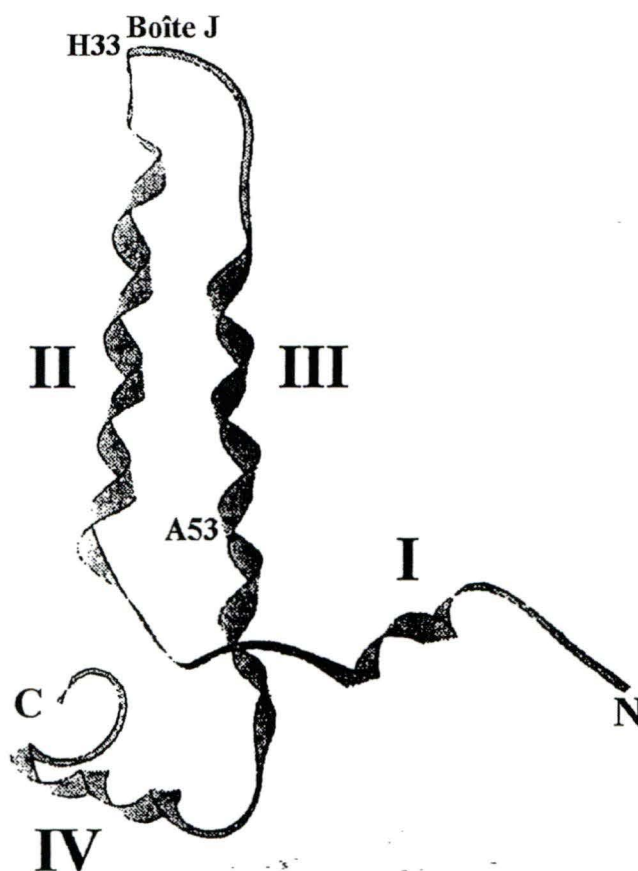
Effet *trans* de la stimulation de la réplication virale.

Les travaux réalisés dans le laboratoire de Schaffhausen indiquent que NT peut contribuer à la réplication en induisant la phosphorylation de CT (Gjorup *et al.*, 1994). Nous avons tenté de rechercher une kinase (facteur F ou X) impliquée dans la phosphorylation de CT et qui serait induite par NT dans des cellules NIH 3T3 établies. Le modèle présenté propose, soit une activation ou une inactivation d'un facteur. Il serait possible que le défaut de CT dans ces cellules provient de l'absence de phosphorylation sur le résidu Thr278 ou de déphosphorylation sur les résidus Ser267, 271 et 274. Puisqu'il a été démontré que CT devenait possiblement phosphorylé en présence de NT, nous avons tenté une investigation de ce côté. *In vitro*, le résidu Thr278 est phosphorylé par le complexe cycline B/p34^{cdc2} (Ludlow, *et al.*, 1989; 1990). En trouvant la kinase qui agit sur le résidu Thr278 *in vivo*, nous aurions été en mesure de vérifier notre modèle. Toutefois nos efforts pour trouver des kinases n'ont pas encore donné de résultats.

Chez SV40, le domaine amino-terminal (résidus 1-82) est également essentiel à la fonction de grand T. Il est important pour la régulation de la transcription, pour l'assemblage des hexamères, pour la production de virions, à la stabilité de grand T, à la stimulation de la synthèse d'ADN cellulaire, et à la capacité de lier la protéine TBP (TATA Binding Protein) (Zhu, *et al.*, 1991; Marsilio *et al.*, 1991; Maulbecker *et al.*, 1992; Peden, *et al.*, 1990; Peden et Pipas, 1992; Weisshart, *et al.*, 1996; Symonds *et al.*, 1993). Il a également été démontré que le domaine amino-terminal de LT de SV40 est impliqué dans l'altération de l'état de phosphorylation des protéines pRB, p130 et p107 (Stubdal, *et al.*, 1996).

Bien que l'on connaisse une liste impressionnante de fonctions, l'activité biochimique associée au domaine amino-terminal de SV40 et de polyome n'est pas connue. Une fonction possible provient de l'observation récente que la séquence en N-terminal présente une certaine homologie avec le domaine J des chaperonnes moléculaires DnaJ (Cheetham, *et al.*, 1992; Kelley et Landry, 1994). On pense que le domaine J est le site d'interaction pour les membres de la famille hsp70 (70-kD heat shock protein); (Silver et Way, 1993). La protéine hsp 70 et les chaperonnes DnaJ fonctionnent ensemble pour participer à une variété d'activités biochimiques comme le repliement des protéines naissantes, la translocation des protéines dans la cellule, la prévention de l'agrégation protéique, la régulation de la conformation protéique, la protéolyse des protéines anormales, la régulation de la transcription, le signallement à l'intérieur de la cellule et la phosphorylation (Georgopoulos et Welch, 1993; Rutheford et Zucker, 1994). Récemment, il a été montré que le domaine J de SV40 présente une interaction spécifique avec hsp70 et que cette interaction est requise pour une réplication efficace de l'ADN viral (Campbell *et al.*, 1997; Kelley et Georgeopoulos, 1997). Le domaine J des antigènes grand T est composé de 3 hélices et de deux boucles et est représentée à la figure 21. La mutation 13val de grand T se retrouve à l'intérieur de l'hélice 1 du domaine J. Cette simple substitution d'un acide aminé inactive la propriété d'immortalisation de grand T et l'habilité que possède NT à compléter CT dans la réplication. Le mutant CT est également un mutant du domaine J puisqu'il ne présente pas les 259 premiers acides aminés de grand T. Il devient alors aisé de formuler l'hypothèse que le facteur recherché, qui stimulerait la réplication du domaine carboxy-terminal et qui aide pRB à immortaliser les cellules serait la même protéine qui agirait via le domaine J de polyome.

A.



B.

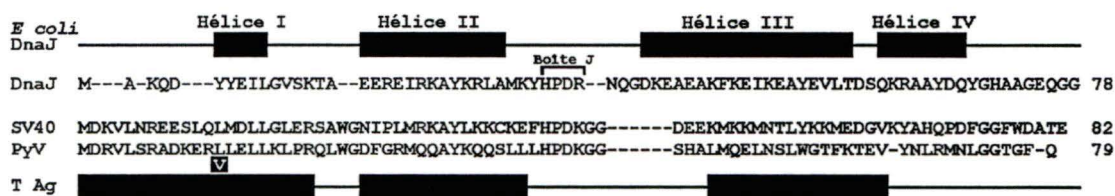


Figure 21. Représentation du domaine J. A. Modèle en ruban du domaine J de la protéine DnaJ de *E. coli*. (Hill *et al.*, 1995). B. Alignement du domaine J de la protéine DnaJ de *E. coli* et du domaine N-terminal des antigènes T (adaptation de Campbell *et al.*, 1997). V, mutation 13val dans grand T de polyome.

Le domaine N-terminal commun aux trois antigènes apparaît être impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, dans la croissance cellulaire, dans l'activation de la transcription, dans l'immortalisation et dans la transformation. Mais un rôle défini de l'amino-terminus dans chacune de ces fonctions demeure inconnu. Le domaine J pourrait jouer un rôle important dans ces fonctions puisqu'il est transcrit dans le cadre de lecture commun aux trois antigènes T (figure 3). Il est donc présent sur tous les antigènes T. Connaissant les multiples fonctions de hsp70/DnaJ, il est probable que le virus ait évolué de façon à conserver le domaine J sur chacune de ses protéines précoces. Pour avoir ainsi un contrôle accru sur la cellule infectée et permettre la production de virions.

Dans des essais de réplication *in vivo*, l'activité répllicative de CT ne peut être stimulé par les antigènes T moyen et petit T dans les cellules NIH 3T3. Puisque NT parvient à stimuler CT, le domaine J de polyome doit donc être relié à un domaine présent en amino-terminus de grand T pour pouvoir agir dans la réplication et dans l'immortalisation cellulaire. Il semble que ce domaine soit le site de liaison à pRB qui n'est pas présent chez T moyen et petit T. Cela ne signifie pas que le domaine J sur les antigènes T moyen et petit T est inactif, il agit peut être à un autre niveau. Par exemple, petit T parvient à transactiver un promoteur E2F (figure 14). On sait que l'activation du promoteur E2F provient de la séparation du complexe pRB/E2F. Par contre, petit T ne possède pas de site de liaison à pRB. Cette transactivation par petit T peut provenir d'une modification de la protéine pRB par l'induction de la phosphorylation. Le domaine J de petit T peut être impliqué. Il est intéressant de noter que les protéines DnaJ sont impliquées dans des événements de phosphorylation et qu'une kinase induite par NT et qui est associée à la phosphorylation de CT est recherché. De plus, nous proposons l'induction de la phosphorylation de pRB par

petit T. La production de mutants à l'intérieur de la structure DnaJ de grand T de polyome permettra de déterminer son implication à la fois dans le cycle cellulaire et dans l'activation du domaine carboxy-terminal de grand T dans la réplication.

Mutation dl97 et réplication virale.

La mutation dl97 est une mutation qui abolit la capacité répliquative de grand T. Cette mutation, à l'intérieur d'un domaine de phosphorylation de grand T, empêche la stimulation de CT par LTdl97. Selon le modèle proposé, il y aurait tout lieu de croire que LTdl97 parvient à stimuler CT puisqu'il possède la totalité de la séquence de l'amino-terminus de grand T. Toutefois, ce n'est pas ce que l'on observe. La présence d'une autre fonction en C-terminus de la protéine empêche cette activation. La structure en doigt de zinc empêche LTdl97 de stimuler CT. Les molécules LTdl97 peuvent lier CT via le doigt de zinc et ainsi conduire à la formation d'hexamères inactifs (figure 22). Toutefois, le domaine amino-terminal de LTdl97 stimule CT. Il y a donc un dosage entre la stimulation et l'inhibition. La capacité de former des hexamères de LTdl97 conduit à la diminution de la quantité d'hexamères CT dans la cellule mais le domaine amino-terminal stimule les protéines CT en les rendant plus actives.

Le même phénomène a été observé avec la protéine grand T. Mais dans ce cas, l'activité stimulatrice de l'amino-terminal de LTdl97 est négligeable. Le mutant LTdl97 possède un caractère dominant négatif vis-à-vis LT. Les niveaux diminués de réplication observés sont le reflet de l'oligomérisation de LTdl97 avec LT. L'absence

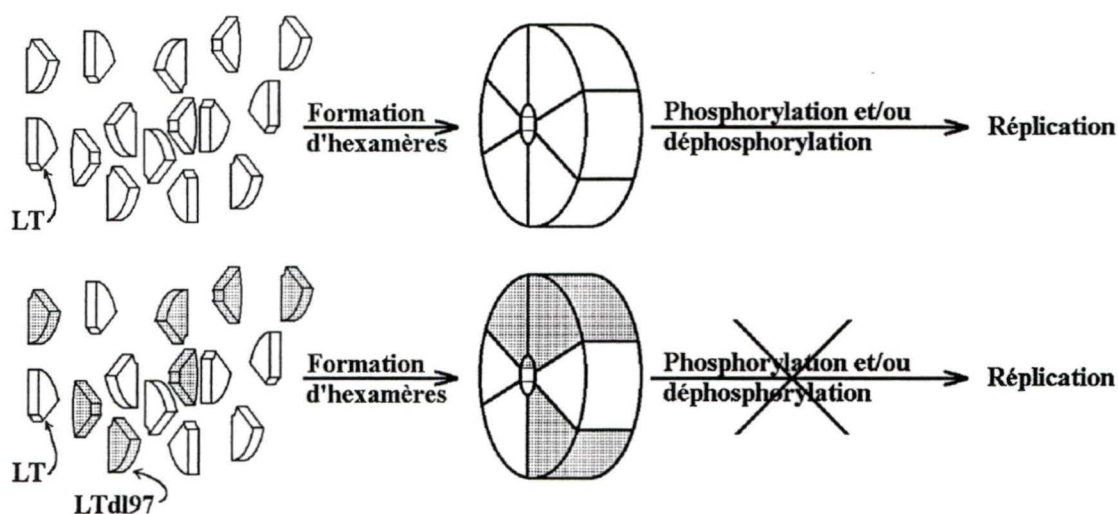


Figure 22. Modèle du caractère dominant négatif de LTdl97. La présence de LTdl97 avec LT conduit à la formation d'hexamères via la structure en doigt de zinc. Ce sont des hexamères hétérogènes inactifs dû à l'absence d'événements de phosphorylation et/ou déphosphorylation sur les résidus absents de LTdl97.

probable d'événements de phosphorylation dans la délétion de LTdl97 empêche la fonctionnalité de l'oligomère (figure 22). Ce défaut dans la réplication a été étudié plus à fond. Il a été observé dans notre laboratoire que la protéine LTdl97 produite dans des cellules d'insectes est sévèrement affectée dans la fonction hélicase et dans l'ouverture des brins d'ADN à l'origine (Lemieux *et al.*, en préparation).

La production future de mutants de grand T dans la région de phosphorylation nous permettra de vérifier nos hypothèses sur l'activation du domaine carboxy-terminal. On sait que la présence d'une thréonine à la position 278 de grand T est essentielle à son fonctionnement. Pour qu'il y ait réplication, il doit y avoir déphosphorylation des sérines adjacentes. Nous nous proposons de produire des mutants de grand T où la thréonine et/ou les sérines seront modifiées et de caractériser ces mutants dans leur activité répllicative.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Marcel Bastin de l'intérêt qu'il n'a cessé d'apporter à mon travail. Sous sa gouverne, j'ai pu acquérir une très bonne autonomie. Je tiens également à souligner l'aide financière du CRM durant mes études.

Je me dois de remercier également les étudiants présents à mon arrivée dans le laboratoire, Cécile Reynaud et Monique Sullivan avec qui j'ai entretenu plusieurs discussions sur la science et sur bien d'autres choses... Un merci un peu spécial à Mme Carole Bergeron qui a découvert la même passion que moi pour la peinture et qui m'a montré les rudiments de la culture cellulaire.

Je me dois de mentionner le Dr Guylain Boissonneault qui m'a accueilli dans son laboratoire durant deux étés au cours de mon Baccalauréat. Ce furent mes premiers pas en recherche et depuis ce temps je n'ai pas cessé de marcher.

Je remercie ma famille pour leurs encouragements lors de ma maîtrise, ma mère Suzanne, mes frères Sylvain et Pierre et mes soeurs Josée et Marlène. Un salut spécial à toi papa qui m'a vu grandir de là-haut et devenir un homme ces 8 dernières années. Je ne peut passer sous silence la présence, l'encouragement, l'attention et la rêverie de ma compagne de vie Martine, je t'aime!

RÉFÉRENCES

- Asselin, C., Bastin, M., (1985), Sequences from polyomavirus and Simian virus 40 large T genes capable of immortalizing primary rat embryo fibroblasts. *J. Virol.* **56**:958-968.
- Asselin, C., Gélinas, C., Bastin, M., (1983), Role of the three polyoma virus early proteins in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **3**:1451-1459.
- Asselin, C., Gélinas, C., Branton, P.E., Bastin, M., (1984), Polyoma middle T antigen requires cooperation from another gene to express the malignant phenotype *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **4**:755-760.
- Asselin, C., Vass-Marengo, J., Bastin, M., (1986), Mutation in the polyomavirus genome that activates the properties of large T associated with neoplastic transformation. *J. Virol.* **57**:165-172.
- Bagchi, S., Weinmann, R., Raychaudhuri, P., (1991), The retinoblastoma protein copurifies with E2F-1 an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* **65**:1063-1072.
- Baru, M., Shlisset, M., Manor, H., (1991), The yeast GAL4 protein transactivates the polyomavirus origin of DNA replication in mouse cells. *J. Virol.* **65**:3496-3503.
- Bastin, M., (1992), Polyomavirus-mediated transformation: A model of multistep carcinogenesis. *Cancer Invest.* **10**:85-92.
- Bautch, V.L., Toda, S., Hassell, S.A., Hanahan, D., (1987), Endothelial cell tumors develop in transgenic mice carrying polyoma virus middle T oncogene. *Cell* **51**:529-538.
- Bennett, E.R., Naujokas, M., Hassell, J.A., (1989), Requirements for species-specific DNA replication. *J. Virol.* **63**:5371-5385.
- Berg, J., (1986), Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science* **232**:485-486.
- Berger, H., Wintersberger, E., (1986), Polyomavirus small T antigen enhance replication of the viral genome in 3T6 mouse fibroblasts. *J. Virol.* **60**:768-770.
- Bishop, J.M., (1987), The molecular genetics of cancer. *Science* **235**:305-311.
- Bishop, J.M., (1991), Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**:235-248.
- Bockus, B.J., Schaffhausen, B., (1987a), Localization of the phosphorylations of polyomavirus large T antigen. *J. Virol.* **61**:1155-1163.
- Bockus, B.J., Schaffhausen, B., (1987b), Phosphorylation of polyomavirus large T antigen: effects of viral mutations and cell growth state. *J. Virol.* **61**:1147-1154.

- Borowiec, J.A., Jurwitz, J., (1988), Localized melting and structural changes in the SV40 origin of replication induced by T-antigen. *EMBO J.* **7**:3149-3158.
- Botchan, M., Topp, W., Sambrook, J., (1978), Studies on SV40 excision from cellular chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**:709-719.
- Bourgau, P., Sylla, B.S., Chartrand, P., (1982), Excision of polyoma virus DNA from that of transformed mouse cell: identification of a hybrid molecule with direct and inverted repeat sequences at the viral-cellular joints. *Virology* **122**:84-97.
- Bradley, M.K., Hudson, J., Villanueva, M.S., Livingston, D.M., (1984), Specific *in vitro* adenylation of the simian virus 40 large tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:6574-6578.
- Bradley, M., Smith, T., Lathrop, R., Livingston, D., Webster, T., (1987), Consensus topography in the ATP binding site in the simian virus 40 and polyomavirus large tumor antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:4026-4030.
- Buchkovich, K., Duffy, L.A., Harlow, E., (1989), The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* **58**:1097-1105.
- Cahill, K.B., Roome, A.J., Carmichael, G.G., (1990), Replication-dependent transactivation of the polyomavirus late promoter. *J. Virol.* **64**:992-1001.
- Campbell, K.S., Mullane, K.P., Aksoy, I.A., Stubdal, H., Zalvide, J., Pipas, J.M., Silver, P.A., Roberts, T.M., Schaffhausen, B.S., DeCaprio, J.A., (1997), DnaJ/hsp40 chaperone domain of SV40 large T antigen promotes efficient viral DNA replication. *Genes Dev.* **11**:1098-1110.
- Campbell, B.A., Villareal, L.P., (1988), Functional analysis of individual enhancer core sequences of polyomavirus: cell-specific uncoupling of DNA replication from transcription. *Mol. Cell. Biol.* **8**:1993-2004.
- Carbone, M.J., Hauser, J., Carty, M.P., Rundell, K., Dixon, K., Levine, A.S., (1992), Simian virus 40 (SV40) small T antigen inhibits SV40 DNA replication *in vitro*. *J. Virol.* **66**:1804-1808.
- Carmichael, G., Schaffhausen, B., Dorsky, D., Oliver, D., Benjamin, T., (1982), The role of the carboxy terminus of middle T antigen of polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:3579-3583.
- Carmichael, G., Schaffhausen, B., Mandel, G., Liang, T.J., Benjamin, T.L., (1984). Transformation by polyoma virus is drastically reduced by substitution of phenylalanine for tyrosine at residue 315 of middle-sized tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:679-683.

Cartwright, C.A., Eckhart, W., Simmon, S., Kaplan, P.L., (1987), Cell transformation by pp60^{c-src} mutated in carboxy terminal regulatory domain. *Cell* **49**:83-91.

Cartwright, C.A., Kaplan, P.L., Cooper, J.A., Hunter, T., Eckhart, W., (1986), Altered sites of tyrosine phosphorylation in pp60^{c-src} associated with polyomavirus middle tumor antigen. *Mol. Cell. Biol.* **6**:1562-1570.

Cegielska, A., Moarefi, I., Fanning, E., Virshup, D.M., (1994), T-antigen kinase Inhibits Simian Virus 40 DNA replication by phosphorylation of intact T antigen on serines 120 and 123. *J. Virol.* **68**:269-275.

Cheetham, M.E., Brion, J-P., Anderton, B.H., (1992), Human homologues of the bacterial heat shock protein DnaJ are preferentially expressed in neurons. *Biochem. J.* **284**:469-476.

Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M., Nevins, J.R., (1991), The E2F transcription factor is a cellular target for the Rb protein. *Cell* **65**:1053-1061.

Chen, P.L., Scully, P., Shew, J.-Y., Wang, J.Y.J., Lee, W.-H., (1989). Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* **58**:1193-1198.

Cheng, S.H., Harvey, R., Piwnica-Worms, H., Espino, P.C., Roberts, T.M., Smith, A.E., (1989), Mechanism of activation of complexed pp60^{c-src} by the middle T antigen of polyomavirus. Dans R. Knippers and A.J. Levine (Ed): Current topics in microbiology and immunology 144: transforming proteins of DNA tumor viruses. Springer-Verlag, New-York. p.109.

Cherington, V., Morgan, B., Spiegelman, B.M., Roberts, T.M., (1986). Recombinant retroviruses that transduce individual polyoma tumor antigens: effects on growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:7988-7992.

Chowdhury, K., (1991), One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **19**: 2792

Cogen, B., (1978), Structure, replication and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J. Gen. Virol.* **42**:1-26.

Cooper, J.A., King, C.S., (1986), Dephosphorylation or antibody binding to the carboxy terminus stimulates pp60^{c-src}. *Mol. Cell. Biol.* **6**:4467-4477.

Courtneidge, S.A., (1989), Further characterization of the complex containing middle T antigen and pp60. Dans R. Knippers et A.J. Levine (eds): Currents topics in microbiology and immunology 144: Transforming proteins of DNA tumor viruses. Springer-Verlag, New-York, p.121.

Courtneidge, S.A., Heber, A., (1987), An 81 kd protein complexed with the middle T antigen and pp60^{c-src}: a possible phosphatidylinositol kinase. *Cell* **50**:1031-1037.

Courtneidge, S.A., Smith, A.E., (1983), Polyoma virus transforming protein associates with the product of the *c-src* cellular gene. *Nature* **303**: 435-439.

Courtneidge, S.A., Smith, A.E., (1984), The complex of polyoma middle T antigen and pp60^{c-src}. *EMBO J.* **4**:585-591.

Cowie, A., Jat, P., Kamen, R., (1982), Determination of sequences at the capped 5'-ends of polyomavirus early region transcripts synthesized *in vivo* and *in vitro* demonstrate an unusual microheterogeneity. *J. Mol. Biol.* **159**:225-255.

Cowie, A., Kamen, R., (1984), Multiple binding sites for polyomavirus large T antigen within regulatory sequences of polyomavirus DNA. *J. Virol.* **52**:750-760.

Cowie, A., Tyndall, C., Kamen, R., (1981), Sequences at the capped 5'ends of polyoma virus late region mRNAs; An example of extreme heterogeneity. *Nucleic Acids Res.* **9**:6305-6322.

Dailey, L., Basilico, C., (1985), Sequences in the polyomavirus DNA regulatory region involved in viral DNA replication and early gene expression. *J. Virol.* **54**:739-749.

Dean, F.B., Bullock, P., Murakami, Y., Wobbe, C.R., Weissbach, L., Hurwitz, J., (1987), Simian virus 40 (SV40) DNA replication: SV40 large T antigen unwinds DNA containing the SV40 origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:16-20.

DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Lynch, D., Furukawa, Y., Griffin, J., Piwnica-Worms, H., Huang, C.H., Livingston, D.M., (1988), SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* **54**:275-283.

DePamphilis, M.L., (1992), DNA replication and the role of transcriptional elements during animal development. Dans P.M. Wassarman (Ed.): *Advances in developmental biochemistry*, vol. 1, JAI Press, Greenwich, Conn., pp.31-83.

DePamphilis, M.L., Martinez-Salas, E., Cupo, D.Y., Hendrickson, E.A., Fritze, C.E., Folk, W.R., Heine, U., (1988), Initiation of polyomavirus and SV40 replication, and the requirements for DNA replication during mammalian development. *Cancer Cells (Cold Spring Harbor)* **6**:165-175.

DePamphilis, M.L., Bradley, M.K., (1986), Replication of SV40 and polyoma virus chromosomes. Dans N.P. Salzman (ed.): *The papovaviridae*, Vol.1. Plenum Publishing Corp., New York, pp.99-246.

de Villiers, J., Schaffner, W., Tyndall, C., Lupton, S., Kamen, R., (1984), Polyomavirus DNA replication requires an enhancer. *Nature* **312**:242-246.

Dilworth, S.M., Hansson, H.A., Darnfors, C., Bjursell, G., Streuli, C.H., Griffin, B.E., (1986), Subcellular localisation of the middle and large T antigens of polyoma virus. *EMBO J.* **5**:491-499.

- Dodson, M., Dean, F.B., Bullock, P., Echols, H., Hurwitz, J., (1987), Unwinding of duplex DNA from the SV40 origin of replication of T antigen. *Science* **238**:964-967.
- Dornreiter, I., Höss, A., Arthur, A.K., Fanning, E., (1990), SV40 T antigen binds directly to the large subunit of purified DNA polymerase alpha. *EMBO J.* **9**:3329-3336.
- Dyson, N., Bernards, R., Friend, S.H., Gooding, L.R., Hassell, J.A., Major, E.O., Pipas, J.M., Vandyque, T., Harlow, E., (1990), Large T antigens of the many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma product. *J. Virol.* **64**:1353-1356.
- Dyson, N., Howley, P.M., Münger, K., Harlow, E., (1989), The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**:934-936.
- Egan, C., Jelsma, T.N., Howe, J.A., Bayley, S.T., Ferguson, B., Branton, P.E., (1988), Mapping of cellular protein-binding sites on products of early-region 1A of human adenovirus type 5. *Mol. Cell. Biol.* **8**:3955-3959.
- Fanning, E., (1994), Control of SV40 DNA replication by protein phosphorylation: a model for cellular DNA replication? *Trends Cell Biol.* **4**:250-255.
- Fanning, E., Knippers, R., (1992), Structure and function of simian virus 40 large tumor antigen. *Annu. Rev. Biochem.* **61**:55-85.
- Farmerie, W.G., Folk, W.R., (1984), Regulation of polyomavirus transcription by large tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:6919-6923.
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B., (1983), A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**:6-13.
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B., (1984), A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Addendum Anal. Biochem.* **137**:266-267.
- Fine, R., Mass, M., Murakami, W.T., (1968), Protein composition of polyoma virus. *J. Mol. Biol.* **36**:167-177.
- Francke, B., Eckhart, W., (1973), Polyoma gene function required for viral DNA synthesis. *Virology* **55**:127-135.
- Freund, R., Bronson, R.T., Benjamin, T.L., (1992), Separation of immortalization from tumor induction with polyoma large T mutants that fail to bind the retinoblastoma gene product. *Oncogene* **7**:1979-1987.
- Fried, M., Griffin, B.E., Lund, E., Robberson, D.L., (1975), Polyoma virus - a study of wild type, mutant and defective DNAs. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **39**:45-52.

- Gaudray, P., Clertant, P., Cuzin, F., (1980), ATP Phosphohydrolase (ATPase) Activity of a polyoma Virus T Antigen. *J. Biochem.* **109**:553-560.
- Gaudray, P., Tyndall, C., Kamen, R., Cuzin, F., (1981), The high affinity binding site on polyoma virus DNA for the viral large T protein. *Nucleic Acids Res.* **9**:5697-5710.
- Gélinas, C., Bastin, M., (1985), Malignant transformation of rat cells by polyomavirus middle T gene. *Virology* **146**:233-245.
- Georgopoulos, C., Welch, W.J., (1993), Rôle of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **9**:601-634.
- Gjorup, O.P., Rose, P.E., Holman, P.S., Bockus, B.J., Schaffhausen, B.S., (1994), Protein domains connect cell cycle stimulation directly to initiation of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:12125-12129.
- Gibson, W., (1984), Polyoma virus proteins: a description of the structural proteins of the virion based on polyacrylamide gel electrophoresis and peptide analysis. *Virology* **62**:319-336.
- Golman, N., Brown, M., Khoury, G., (1991), Modification of SV40 T antigen by poly ADP-ribosylation. *Cell* **24**:567-572.
- Gorman, C.M., Moffat, L.F., Howard, B.H., (1982), Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**:1044-1051.
- Gross, L., (1953a), A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **83**:414-421.
- Gross, L., (1953b), Neck tumor, or leukemia developing in adult C3H mice following inoculation in early infancy with filtered or centrifuged Ak-leukemic extracts. *Cancer* **6**:948-957.
- Guo, Z.S., Gutierrez, C., Heine, U., Sogo, J.M., DePamphilis, M.L., (1989), Origin auxiliary sequences can facilitate initiation of simian virus 40 DNA replication *in vitro* as they do *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **9**:3593-3602.
- Guo, Z.S., Heine, U., DePamphilis, M.L., (1991), T antigen binding to site I facilitates initiation of SV40 DNA replication but does not affect bidirectionality. *Nucleic Acids Res.* **19**:7081-7088.
- Guy, C.T., Cardiff, R.D., Muller, W.J., (1992), Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol. Cell. Biol.* **12**:954-961.

- Hanks, S.K., Lawton, M.A., (1993) Homology-based approaches for identifying cDNAs that encode eucaryotic protein (serine/threonine) and protein (tyrosine) kinases. In *Protein Phosphorylation a practical Approach*, IRL Press, New York, 173-196.
- Hassell, J.A., Muller, W.J., Mueller, C.R., (1986), The dual role of the polyomavirus enhancer in transcription and DNA replication. *Cancer Cells (Cold Spring Harbor)* **4**:561-569.
- Heiser, W.C., Eckhart, W., (1982), Polyoma virus early and late mRNA's in productively infected mouse 3T6 cells. *J. Virol.* **44**:175-188.
- Hendrickson, E.A., Fritze, C.E., Folk, W.R., DePamphilis, M.L., (1987), The origin of bidirectional DNA replication in polyoma virus. *EMBO J.* **6**:2011-2018.
- Herbomel, P., Bourachot, B., Yaniv, M., (1984), Two distinct enhancers with different cell specificities coexist in the regulatory region of polyoma. *Cell* **39**:653-662.
- Herwig, S., Strauss, M., (1997), The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **246**: 581-601.
- Hill, R.B., Flanagan, J.M., Prestegard, J.H., (1995), ^1H and ^{15}N magnetic resonance assignments, secondary structure, and tertiary fold of *Escherichia coli* DnaJ(1-78). *Biochem.* **34**:5587-5596.
- Hirt, B., (1967), Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* **26**:365-369.
- Holman, P.S., Gjoerup, O.V., Davin, T., Schaffhausen, B.S., (1994), Characterization of an immortalizing N-terminal domain of polyoma large T antigen. *J. Virol.* **68**:668-673.
- Howes, S.H., Bockus, B.J., Schaffhausen, B.S., (1996), Genetic analysis of polyomavirus large T nuclear localisation: Nuclear localisation is required for productive association with pRb family members. *J. Virol.* **70**:3581-3588.
- Huang, H.J.S., Lee, J.K., Shew, J.Y., Chen, P.L., Bookstein, R., Friedmann, T., Lee, E.Y.H.P., Lee, W.H., (1988), Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* **242**:1563-1566.
- Hubbard, S.R., Bishop, W.R., Kirschmeier, P., George, S.J., Cramer, S.P., Hendrickson, W.A., (1991), Identification and characterization of zinc binding sites in protein kinase C. *Science* **254**:1776-1779.
- Hunter, T., (1991), Cooperation between oncogenes. *Cell* **64**:249-270.
- Hutchinson, M.A., Hunter, T., Eckart, R., (1978), Characterization of T antigens in polyoma infected and transformed cells. *Cell* **15**:65-77.

- Ito, Y., (1979), Polyoma specific 55K protein isolated from plasma membrane of productively infected cells is virus coded and important for cell transformation. *Virology* **98**:261-266.
- Ito, Y., Brocklehurst J.R., Dulbecco, R., (1977), Virus-specific proteins in the plasma membrane of cells lytically infected or transformed by polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:4666.
- Jarvis, D.L., Butel, J.S., (1985), Modification of simian virus 40 large tumor antigen by glycosylation. *Virology* **141**:173-189.
- Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D., Nevins, J.R., (1993), Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **365**:349-352.
- Jones, N.C., Rigby, P.W.J., Ziff, E.B., (1988), Trans-acting protein factors and the regulation of eucaryotic transcription: Lessons from studies on DNA tumor viruses. *Genes Dev.* **2**:267-281.
- Kamen, R., Favaloro, J., Parker, J., Triesman, R., Lania, L., Fried, M., Mellor, A., (1980), Comparaisou of polyoma virus transcription in productively infected mouse cells and transformed rodent cell lines. *Cold Sprig Harbor Symp. Quant. Biol.* **44**:63-75.
- Kamen, R., Jat, P., Triesman, R., Favaloro, J., (1982), 5' termini of polyoma virus early region transcripts synthesized *in vivo* by wild type virus and viable deletion mutants. *J. Mol. Biol.* **159**:189-224.
- Kaplan, D.R., Pallas, D.C., Morgan, W., Schaffaussen, B., Roberts, T.M., (1988), Mechanisms of transformation by polyoma virus middle T antigen. *Biochem. Biophys. Acta* **948**:345-364.
- Kawai, S., Nishizawa, M., (1984), New procedure for DNA transfection polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **4**:1172-1174.
- Kelley, W.L., Georgopoulos, C., (1997), The T/t common exon of simian virus 40, JC, and BK polyomavirus T antigens can functionally replace the J-domain of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperone. *Proc. Natl. Acac. Sci. USA* **94**:3697-3684.
- Kelley, W.L., Landry, S.J., (1994), Chaperone power in a virus ? *Trends Biochem. Sci.* **19**:277-278.
- Kenny, M.K., Lee, S.H., Hurwitz, J., (1989), Multiple functions of human single-stranded-DNA binding protein in simian virus 40 DNA replication: Single-strand stabilization and stimulation of DNA polymerases a and b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:9757-9761.
- Kern, F.G., Pellegrini, S., Cowie, A., Basilico, C., (1986), Regulaiton of polyomavirus late promoter activity by viral early proteins. *J. Virol.* **60**:275-285.

- Khoury, G., Gruss, P., (1983), Enhancer elements. *Cell* **33**:313-314.
- Kingston, R.E., Cowie, A., Morimoto, R.I., Gwinn, K.A., (1986), Binding of polyoma large T antigen to the human hsp70 promoter is not required for transactivation. *Mol. Cell. Biol.* **6**:3180-3190.
- Kmieciak, T.E., Shalloway, D., (1987), Activation and suppression of pp60^{c-src} transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell* **49**:65-73.
- Kornbluth, S., Cheng, S.H., Markland, W., Fukui, Y., Hanafusa, H., (1990), Association of p62^{c-yes} with polyomavirus middle T-antigen mutants correlates with transforming ability. *J. Virol.* **64**:1584-1589.
- Kornbluth, S., Sudol, M., Hanafusa, H., (1986), Association of the polyomavirus middle-T antigen with *c-yes* protein. *Nature* **325**:171-173.
- Kypta, R.M., Hemming, A., Courtneidge, S.A., (1988), Identification and characterization of p59^{l^{yn}} (a *src*-like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.* **7**:3837-3844.
- Land, H., Parada, L.F., Weinberg, R.A., (1983), Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* **304**:596-602.
- Larose, A., Dyson, N., Sullivan, M., Harlow, E., Bastin, M., (1991), Polyomavirus Large T mutants affected in retinoblastoma protein binding are defective in immortalization. *J. Virol.* **65**:2308-2313.
- Larose, A., St-Onge, L., Bastin, M., (1990), Mutations in polyomavirus large T affecting immortalization of primary rat embryo fibroblasts. *Virology* **176**:98-105.
- Laurent, S., Frances, V., Bastin, M., (1995), Intrachromosomal recombination mediated by the polyomavirus large T antigen. *Virology* **206**:227-233.
- Lee, W.H., Bookstein, R., Lee, E.Y.H.P., (1988), Studies on the human retinoblastoma susceptibility gene. *J. Cell. Biochem.* **38**:157-165.
- Lemieux, B., Kaymak, B., Reynaud, C., Bastin, M., (en préparation), Polyomavirus large T mutants affected in viral DNA replication.
- Loeber, G., Stenger, J., Ray, S., Parsons, R.E., Anderson, M.E., Tegtmeyer, P., (1991), The zinc finger region of simian virus 40 large T antigen is needed for hexamer assembly and origin melting. *J. Virol.* **65**:3167-3174.
- Lorimer, H.E., (1992), Nucleotide dependent interactions of polyomavirus and simian virus 40 large T antigen with viral origin DNA. (Thèse de doctorat). Columbia University, New York, N.Y.

- Ludlow, J.W., DeCaprio, J.A., Huang, C.-M., Lee, W.-H., Paucha, E., Livingston, D.M., (1989), SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* **56**:57-65.
- Ludlow, J.W., Glendening, C.L., Livingston, D.M., DeCaprio, J.A., (1993), Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* **13**:367-372.
- Ludlow, J.W., Shon, J., Pipas, J.M., Livingston, D.M., DeCaprio, J.A., (1990), The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T. *Cell* **60**:387-396.
- Luthman, H., Nilsson, M.G., Magnusson, G., (1982), Noncontiguous segment of the polyoma gene required in cis for DNA replication. *J. Mol. Biol.* **161**:533-550.
- Maione, R., Finia, G.H., Holman, P., Schaffhausen, B., Amati, P., (1994), Retinoblastoma antioncogene is involved in the inhibition of myogenesis by polyomavirus large T antigen. *Cell Growth Differ.* **5**:231-237.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., (1982, 1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New-York.
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., Collins, F.S., (1991), Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* **19**:1154.
- Marsilio, E., Cheng, S.H., Schaffhausen, B., Paucha, E., Livingston, D.M., (1991), The T/t common region of simian virus 40 large T antigen contains a distinct transformation-governing sequence. *J. Virol.* **65**:5647-5652.
- Martens, I., Nilsson, A., Linder, S., Magnusson, G., (1989), Mutational analysis of polyomavirus small-t-antigen functions in productive infection and in transformation. *J. Virol.* **63**:2126-2133.
- Martin, M.E., Piette, J., Yaniv, M., Tang, W.J., Folk, W.R., (1988), Activation of the polyoma enhancer by a murine activator protein 1 (AP1) homolog and two contiguous proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5839-5843.
- Martinez-Salas, E., Cupo, D.Y., DePamphilis, M.L., (1988), The need for enhancers is aquired upon formation of a diploid nucleus during early mouse development. *Genes Dev.* **2**:1115-1126.
- Martinez-Salas, E., Linney, E., Hassell, J., DePamphilis, M.L., (1989), The need for enhancers in gene expression first appears during mouse development with formation of the zygotic nucleus. *Genes Dev.* **3**:1493-1506.

- Mastrangelo, L.A., Hough, P.V.C., Wall, J.S., Dodson, M., Dean, F.B., Hurwitz, J., (1989), ATP-dependent assembly of double hexamers of SV40 T antigen at the viral origin of DNA replication. *Nature* **338**:658-662.
- Maulbecker, C., Mohr, I., Gluzman, Y., Bartholomew, J., Botchan, M., (1992), A deletion in the simian virus 40 large T antigen impairs lytic replication in monkey cells *in vivo* but enhances DNA replication *in vitro*: new complementation function of T antigen. *J. Virol.* **66**:2195-2207.
- Melin, F., Kemler, R., Kress, C., Pinon, H., Blangy, D., (1991), Host range specificity of polyomavirus EC mutants in mouse embryonal carcinoma, embryonal stem cells and preimplantation embryos. *J. Virol.* **65**:3029-3043.
- Mellor, A., Smith, A.E., (1978), Characterization of the amino-terminal tryptic peptide of simian virus 40 small-t and large-T antigens. *J. Virol.* **28**:992-996.
- Mes, A.M., Hassell, J.A., (1982), Polyoma viral middle T antigen is required for transformation. *J. Virol.* **42**:621-629.
- Moarefi, I.F., Small, D., Gilbert, I., Höpfner, M., Randall, S.K., Schneider, C., Russo, A.A.R., Ramsperger, U., Arthur, A.K., Stahl, H., Kelly, T.J., Fanning, H., (1993), Mutations of the cyclin-dependent kinase phosphorylation site in simian virus 40 (SV40) large T antigen specifically blocks SV40 origin DNA unwinding. *J. Virol.* **67**:4992-5002.
- Mudryj, M., Devoto, S.H., Hiebert, S.W., Hunter, T., Pines, J., Nevins, J.R., (1991), Cell cycle regulation of the E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A. *Cell* **65**:1243-1253.
- Mudryj, M., Hiebert, S.W., Nevins, J.R., (1990), A role for the adenovirus inducible E2F transcription factor in a proliferation dependant signal transduction pathway. *EMBO J.* **9**:2179-2184.
- Mueller, C.R., Muller, W.J., Hassell, J.A., (1988), The polyomavirus enhancer comprises multiple functional elements. *J. Virol.* **62**:1667-1678.
- Mueller, C.R., Mes-Masson, A.-M., Bouvier, M., Hassell, J.A., (1984), Location of sequences in polyomavirus DNA that are required for early gene expression *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **4**:2594-2609.
- Muller, W.J., Dufort, D., Hassell, J.A., (1988), Multiple subelements within the polyomavirus enhancer function synergistically to activate DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **8**:5000-5015.
- Muller, W.J., Naujokas, M.A., Hassell, J.A., (1983), Polyomavirus-plasmid recombinants capable of replicating have an enhanced transforming potential. *Mol. Cell. Biol.* **3**:1670-1674.

- Murakami, Y., Asano, M., Satake, M., Ito, Y., (1990), A tumor promoting phorbol ester, TPA, enhances polyoma DNA replication by activating the function of the viral enhancer. *Oncogene* **5**:5-13.
- Murakami, Y., Satake, M., Yamaguchi-Iwai, Y., Sakai, M., Murumatsu, M., Ito, Y., (1991), The nuclear proto-oncogenes *c-fos* and *c-jun* as regulators of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **88**:3947-3951.
- Murakami, Y., Eki, T., Hamada, M., Prives, C., Hurwitz, J., (1986), Species-specific *in vitro* synthesis of DNA containing the polyoma virus origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:6347-6351.
- Nilsson, M., Österlund, M., Magnusson, G., (1991), Analysis of polyomavirus enhancer. Effect on DNA replication and early gene expression. *J. Mol. Biol.* **218**: 479-483.
- Noda, T., Satake, M., Robins, T., Ito, Y., (1986), Isolation and characterization of NIH 3T3 cells expressing polyomavirus small T antigen. *J. Virol.* **60**:105-113.
- O'Connor, D.T., Subramani, S., (1988), Do transcriptional enhancers also augment DNA replication? *Nucleic Acid Res.* **16**:11207-11222.
- Ogris, E., Mudrak, I., Wintersberger, E., (1992), Polyomavirus large and small T antigens cooperate in induction of the S phase in serum-starved 3T3 mouse fibroblasts. *J. Virol.* **66**:53-61.
- Ogris, E., Rotheneder, H., Mudrak, I., Pichler, A., Wintersberger, E., (1993), A binding site for transcription factor E2F is a target for trans activation of murine thymidine kinase by polyomavirus large T antigen and plays an important role in growth regulation of the gene. *J. Virol.* **67**:1765-1771.
- Oxman, M.N., Takemoto, K.K., Eckhart, E., (1972), Polyoma T antigen synthesis by temperature-sensitive mutants of polyoma virus. *Virology* **49**:675-682.
- Pallas, D.C., Cherington, V., Morgan, W., Deanda, J., Kaplan, D., Schaffhausen, B., Roberts, T.M., (1988), Cellular proteins that associate with the middle and small T antigens of polyomavirus. *J. Virol.* **62**:3934-3940.
- Pallas, D.C., Shahrik, L.K., Martin, B.L., Jaspers, S., Miller, T.M., Brautigan, D.L., Roberts, T.M., (1990), Polyoma small and middle T antigens and the SV40 small T antigen form stable complexes with phosphatase 2A. *Cell* **60**:167-176.
- Pannuti, A., Pascucci, A., La Mantia, G., Fischer-Fantuzzi, L., Vesco, C., Lania, L., (1987), Trans-activation of cellular and viral promoters by a transforming nonkaryophilic simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* **61**:1296-1299.

- Parsons, R., Anderson, M.E., Tegtmeyer, P., (1990), Three domains in the simian virus 40 core origin orchestrate the binding, melting, and DNA helicase activities of T antigen. *J. Virol.* **64**:509-518
- Peden, K.W., Pipas, J.M., (1992), Simian virus 40 mutants with amino-acid substitutions near the amino-terminus of large T antigen. *Virus Genes* **6**:107-118.
- Peden, K.W.C., Spence, S.L., Tack, L.C., Cartwright, C.A., Srinivasan, A., Pipas, J.M., (1990), A DNA replication-positive mutant of simian virus 40 that is defective for transformation and the production of infectious virions. *J. Virol.* **64**:2912-2921.
- Pelligrini, S., Dailey, L., Basilico, (1984), Amplification and excision of integrated polyoma DNA sequences require a unctinal origin of replication. *Cell* **36**:943-949.
- Piette, J., Kryske, M.H., Yaniv, M., (1985), Specific interaction of cellular factors with the B enhancer of polyomavirus virus. *EMBO J.* **4**:2675-2685.
- Pipas, J.M., (1992), Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. *J. Virol.* **66**:3979-3985.
- Piwnica-Worms, H., Saunders, K.B., Roberts, T.M., Smith, A.E., Cheng, S.H., (1987), Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical properties of pp60^{c-src}. *Cell* **49**:75-82.
- Pomerantz, B.J., Hassell, J.A., (1984), Polyomavirus and simian virus 40 large T antigens bind to common DNA sequences. *J. Virol.* **49**:925-937.
- Pomerantz, B.J., Muller, C.R., Hassell, J.A., (1983), Polyomavirus large T antigen binds independently to multiple, unique regions on the viral genome. *J. Virol.* **47**:600-610.
- Prives, C., (1990), The replication functions of SV40 T antigen are regulated by phosphorylation. *Cell* **61**:735-738.
- Prives, C., Murakami, Y., Kern, F.G., Folk, W., Basilico, C., Hurwitz, J., (1987), DNA sequence requirements for replication of polyomavirus DNA *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **7**:3694-3704.
- Rassoulzadegan, M., Cowie, A., Carr, A., Glaichenhaus, N., Kamen, R., Cuzin, F., (1982), The role of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* **300**:713-718.
- Rassoulzadegan, M., Naghashfar, Z., Cowie, A., Carr, A., Grisoni, R., Kamen, R., Cuzin, F., (1983), Expression of the large T protein of polyomavirus promotes the establishment in culture of "normal" rodent fibroblast cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:4354-4358.
- Richardson, W.D., Roberts, B.L., Smith, A.E., (1986), Nuclear location signals in polyoma virus large-T. *Cell* **44**:77-85.

- Roberge, C., Bastin, M., (1988), Site-directed mutagenesis of the polyomavirus genome: Replication-defective large T mutants with increased potential. *Virology* **162**:144-150.
- Rochford, R., Davis, C.T., Yoshimoto, K.K., Villareal, L.P., (1990), Minimal subenhancer requirements for high-level polyomavirus DNA replication: a cell-synergy of PEA3 and PEA1 sites. *Mol. Cell. Biol.* **10**:4996-5001.
- Rose, P.E., Shaffhausen, B.S., (1995), Zinc-binding and protein-protein interactions mediated by the polyomavirus large T antigen zinc finger. *J. Virol.* **69**:2842-2849.
- Ruediger, R., Roeckel, D., Fait, J., Bergqvist, A., Magnusson, G., Walter, G., (1992), Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus. *Mol. Cell. Biol.* **12**:4872-4882.
- Ruley, H.E., (1983), Adenovirus early region E1a enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304**:602-606.
- Rutherford, S.L., Zuker, C.S., (1994), Protein folding and the regulation of signaling pathways. *Cell* **79**:1129-1132.
- Salzman, N.P., *ed.*, (1986), The papovaviridea. Vol.1. Plenum Press. New York, U.S.A., 459p.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
- Satake, M., Furukawa, K., Ito, Y., (1988), Biological activities of oligonucleotides spanning the θ point mutation within the enhancer region of polyomavirus DNA. *J. Virol.* **62**:970-977.
- Seoda, E., Arrand, J.R., Smolar, N., Walsh, J.E., Griffin, B.E., (1980), Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome. *Nature* **283**:445-453.
- Schaffhausen, B., (1982), Transforming genes and gene products of polyoma and SV40. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **13**:215-286.
- Schaffhausen, B.S., Silver, J.E., Benjamin, T.L., (1978), Tumor antigens in cells productively infected by wild-type polyoma virus and mutant NG18. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:79-83.
- Scheffner, M., Welssel, R., Stahl, H., (1989), SV40 T antigen catalyzed duplex DNA unwinding. Dans R. Knippers and A.J. Levine (Eds): Current topics in microbiology and immunology 144: Transforming proteins of DNA tumor virus. Springer-Verlag, New-York, p.37.
- Scheidtmann, K.H., Mumby, M.C., Rundell, K., Walter, G., (1991a), Dephosphorylation of simian virus T antigen and p53 protein by protein phosphatase 2A: inhibition by small T antigen. *Mol. Cell. Biol.* **11**:1996-2003.

- Scheidtmann, K.H., Virshup, D.M., Kelly, T.J., (1991b), Protein phosphatase 2A dephosphorylates simian virus large T antigen specifically at residues involved in the regulation of the DNA-binding activity. *J. Virol.* **65**:2098-2101.
- Scheller, A., Prives, C., (1985), Simian virus 40 and polyomavirus large tumor antigens have different requirements for high-affinity sequence specific DNA binding. *J. Virol.* **54**:532-545.
- Schlegel, R., Benjamin, T.L., (1978), Cellular alterations dependent upon the polyoma virus hr-t function: separation of mitogenic from transforming capacities. *Cell* **14**:587-599.
- Shah, K.V., (1990), Polyomaviruses. *Virology*, second edition. Raven Press, Ltd. 1609-1623.
- Shenolikar, S., Nairn, A.C., (1991), Protein phosphatases: recent progress. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **23**:1-121.
- Sidle, A., Palaty, C., Dirks, P., O'Neil, W., Kiess, M., Gill, R.M., Wong, K., Hamel, P.A., (1996), Activity of the retinoblastoma family proteins, pRB, p107, and p130, during Cellular proliferation and differentiation. *Critical Reviews in Biochem. and Mol. Biol.* **31**:237-271.
- Silver, J., Schaffhausen, B., Benjamin, T., (1978), Tumor antigens induced by nontransforming mutants of polyomavirus. *Cell* **15**:485-496.
- Silver, P.A., Way, J.C., (1993), Eucaryotic DnaJ homologs and the specificity of Hsp70 activity. *Cell* **74**:5-6.
- Smale, S.T., Tjian, R., (1986), T-antigen-DNA polymerase a complex implicated in simian virus 40 DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **6**:4077-4087.
- Smart, J.E., Ito, Y., (1978), Three species of polyomavirus tumor antigens share common peptides probaly near the amino termini of the proteins. *Cell* **15**:1427-1437.
- Soeda, E., Arrand, J.R., Smolar, N., Walsh, J.E., Griffin, B.E., (1980), Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome. *Nature* **283**:445-453.
- Southern, E.M., (1975), Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- St-Onge, L., Bastin, M., (1994), Transcription activation mediated by chromosomal inversion in rat cells. *Oncogene* **9**:781-789.
- Stahl, H., Droge, P., Knippers, R., (1986), DNA helicase activity of SV40 large T tumor antigen. *EMBO J.* **5**:1939-1944.
- Stewart, S.E., Eddy, B.E., (1959), Properties of a tumor-inducing virus recovered from mouse neoplasms. *Perspectives in virology*, vol. 1., M. Pollard, New York, 245p.

Stillman, B., (1989), Initiation of eucaryotic DNA replication *in vitro*. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**:197-245.

Stubdal, H., Zalvide, J., DeCaprio, J.A., (1996), Simian virus 40 large T antigen alters the phosphorylation state of the RB-related proteins p130 and p107. *J. Virol.* **70**:2781-2788.

Sullivan, M., (1991), Immobilisation par l'antigène grand T du virus du polyôme. Mémoire de maîtrise, Département de microbiologie, Université de Sherbrooke, 62p.

Sunstrom, N.A., Acheson, N.H., Hassell, J.A., (1991), Determination of the origin specific DNA binding domain of polyomavirus large T antigen. *J. Virol.* **65**:6998-7003.

Symonds, H.S., McCarthy, S.A., Chen, J., Pipas, J.M., Van Dyke, T., (1993), Use of transgenic mice reveals cell-specific transformation by a simian virus 40 T-antigen amino-terminal mutant. *Mol. Cell. Biol.* **13**:3255-3265.

Tang, W.J., Berger, S.L., Triezenberg, S.J., Folk, W.R., (1987), Nucleotides in the polyomavirus enhancer that control viral transcription and DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **7**:1681-1690.

Templeton, D., Eckhart, W., (1982), Mutation causing premature termination of polyoma virus medium T antigen blocks cell transformation. *J. Virol.* **41**:1014-1024.

Templeton, D., Voronova, A., Eckhart, W., (1984), Construction and expression of a recombinant DNA gene encoding a polyoma middle-size tumor antigen with the carboxylterminus of the VSV glycoprotein G. *Mol. Cell. Biol.* **4**:282-289.

Templeton, D., Simon, S., Eckhart, W., (1986), Truncated forms of the polyomavirus middle T can substitute for the small T antigen in lytic infection. *J. Virol.* **57**:367-370.

Tooze, J. *ed.*, (1981), Molecular biology of the tumor viruses: DNA tumor viruses, second edition part 2. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1073p.

Treisman, R., Novak, U., Favalaro, J., Jat, P., Kamen, R., (1981). The structures of the spliced mRNAs encoding polyoma virus early region proteins. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**:83-92.

Treisman, R., Novak, U., Favalaro, J., Kamen, R., (1981), Transformation of rat cells by an altered polyomavirus genome expressing only the middle T protein. *Nature* **292**:595-600.

Türler, H., Salomon, C., (1985), Small and middle T antigens contribute to lytic and abortive polyomavirus infections. *J. Virol.* **53**:597-586.

Tyndall, C., La Mantia, G., Thacker, C.M., Favalaro, J., Kamen, R., (1981), A region of the polyomavirus genome between the replication origin and the late protein coding sequences is required in cis for both early gene expression and viral DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **9**:6231-6250.

- Veldman, G.M., Lupton, S., Kamen, R., (1985), Polyomavirus enhancer contains multiple redundant elements that activate both DNA replication and gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **5**:649-658.
- Villareal, L.P., *ed.*, (1989), Common mechanisms of transformation by small DNA tumor viruses. American Society for Microbiology. Washington, U.S.A., 259p.
- Virshup, D.M., Kauffman, M.G., Kelly, T.J., (1989), Activation of SV40 DNA replication *in vitro* by cellular protein phosphatase 2A. *EMBO J.* **8**:3891-3898.
- Virshup, D.M., Russo, A.A.R., Kelly, T.J., (1992), Mechanism of activation of simian virus 40 DNA replication by protein phosphatase 2A. *Mol. Cell. Biol.* **12**:4883-4895.
- Wasylyk, C., Schneikert, J., Wasylyk, B., (1990), Oncogene *v-jun* modulates DNA replication. *Oncogene* **5**:1055-1058.
- Webster, L.C., Ricciardi, R.P., (1991), *trans*-Dominant mutants of E1A provide genetic evidence that the zinc finger of the *trans*-activating domain binds a transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **11**:4287-4296.
- Weichselbraun, I., Haider, G., Wintersberger, E., (1989), Optimal replication of plasmids carrying polyomavirus origin regions requires two high-affinity binding sites for large T antigen. *J. Virol.* **63**:961-964.
- Weinberg, R.A., (1985), The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science* **230**:770-776.
- Weinberg, R.A., (1990), The retinoblastoma gene and cell growth control. *Trends Biochem. Sci.* **15**:199-202.
- Weinberg, R.A., (1995), The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**:323-330.
- Weissbart, K., Bradley, M.K., Weiner, B.M., Schneider, C., Moarefi, I., Fanning, E., Arthur, A.K., (1996), An N-terminal deletion mutant of simian virus 40 (SV40) large T antigen oligomerizes incorrectly on SV40 DNA but retains the ability to bind to DNA polymerase α and replicate SV40 DNA *in vitro*. *J. Virol.* **70**:3509-3516.
- Wessel, R., Schweizer, J., Stahl, H., (1992), Simian virus 40 T-antigen DNA helicase is hexamer which forms a binary complex during bidirectional unwinding from the viral origin of DNA replication. *J. Virol.* **66**:804-815.
- Whitman, M., Downes, C.P., Keeler, M., Keller, T., Cantley, L., (1988), Type I phosphatidylinositol kinase make a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* **332**:644-646.

- Whitman, M., Kaplan, D., Roberts, T., Cantley, L., (1987), Evidence for two distinct phosphatidylinositol kinases in fibroblasts: implication for cellular regulation. *Biochem. J.* **247**:165-174.
- Whitman, M., Kaplan, D.R., Schaffhausen, B., Cantley, L., Roberts, T.M., (1985), Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle T oncogene competent for transformation. *Nature* **315**:239-242.
- Whyte, P., Buchkovich, K.J., Horowitz, J.M., Friend, S.H., Raybuck, M., Weinberg, R.A., Harlow, E., (1988), Association between an oncogene and an antioncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature (London)* **334**:124-129.
- Whyte, P., Williamson, N.M., Harlow, E., (1989), Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* **56**:67-75.
- Williams, R.L., Courtneidge, S.A., Wagner, E.F., (1988), Embryonic lethalties and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. *Cell* **52**:121-131.
- Williams, R.L., Risau, W., Zerwes, H.G., Drexler, H., Aguzzi, A., Wagner, E.F., (1989) Endothelioma cells expressing the polyoma middle T oncogene induce hemangiomas by host cell recruitment. *Cell* **57**:1053-1063.
- Wold, M.S., Li, J.J., Kelly, T.J., (1987), Initiation of the simian virus 40 DNA replication *in vitro*: Large tumor antigen and origin-dependent unwinding of the template. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:3543-3647.
- Wong, S.W., Schaffer, P.A., (1991), Elements in the transcriptional regulatory region flanking herpes simplex virus oriS stimulate origin function. *J. Virol.* **65**:2601-2611.
- Xin, J.H., Cowie, A., Lachance, P., Hassell, J.A., (1992), Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the Ets oncogene family differentially expressed in mouse embryonic cells. *Genes Dev.* **6**:481-496.
- Zhu, J., Abate, M., Rice, P.W., Cole, C.N., (1991), The ability of simian virus 40 large T antigen to immortalize primary mouse embryo fibroblasts cosegregates with its ability to bind to p53. *J. Virol.* **65**:6872-6880.
- Zhu, J., Rice, P.W., Chamberlain, M., Cole, C.N., (1991), Mapping the transcriptional transactivation function of simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* **65**:2778-2790.
- Zhu, Z., Veldman, G.M., Cowie, A., Carr, A., Schaffhausen, B., Kamen, R., (1984), Construction and functional characterization of polyomavirus genomes that separately encode the three early proteins. *J. Virol.* **51**:170-180.